

**Diagnostic de la Pneumopathie dite « Atypique
Primitive » due au Mycoplasma Pneumoniae
(Agent d'Eaton)
par la Technique d'Immunofluorescence**

Travail du Laboratoire d'Hygiène de la Faculté Mixte de
Médecine et Pharmacie de LYON (Professeur SOHIER)

THÈSE

PRESENTEE

A LA FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON
ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 18 DECEMBRE 1963
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MEDECINE

PAR

PICARD Jean-Paul

Ancien Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire

Né le 21 Février 1938 à HENDAYE (Basses-Pyrénées)



IMPRIMERIE JANODY
23, Cours Docteur-Long
LYON

1963

DIAGNOSTIC DE LA
PNEUMOPATHIE DITE « ATYPIQUE PRIMITIVE »
DUE AU MYCOPLASMA PNEUMONIAE
(AGENT D'EATON)
PAR LA TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

M. J. LEPINE : Doyen Honoraire, membre de l'Institut
M. H. HERMANN : Doyen Honoraire Correspondant de l'Institut
M. J.-F. CIER : Doyen
MM. M. LEVRAT, Assesseur, L. REVOL, Assesseur

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN,
GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY, DUCLOS, GUILLEMINET, HERMANN, ROCHET

PROFESSEURS

Physiologie A	MM. CIER J.-F.
Clinique urologique	CIBERT
Physique biologique	PONTHUS (détaché à Beyrouth)
Clinique neuro-psychiatrique et hygiène mentale	DECHAUME
Chimie organique et toxicologie	CHAMBON
Clinique chirurgicale B	WERTHEIMER
Clinique médicale B	PAUPERT-RAVAULT
Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires	FROMENT
Clinique médicale C	CROIZAT
Chimie biologique et médicale	ENSELME
Clinique chirurgicale A	MALLET-GUY
Pharmacie galénique et matière médicale	REVOL
Clinique gynécologique	POLLOSSON
Clinique obstétricale	PIGEAUD
Médecine du travail	BOURRET
Clinique médicale A	SOHIER
Hygiène et action sanitaire et sociale	LEVRAT
Botanique et cryptogamie	NETIEN
Clinique chirurgicale C	BERTRAND
Chimie analytique pharmaceutique	BADINAND
Pharmacie chimique et pharmacologie	DREVON
Médecine légale et déontologie	ROCHE
Parasitologie et pathologie exotique	COUDERT
Clinique d'oto-rhino-laryngologie et d'audio-phonologie	MOUNIER-KUHN
Clinique ophtalmologique	PAUFIQUE
Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie	THIERS
Clinique de pneumo-phtisiologie	BRUN
Clinique traumatologique des membres	CREYSSEL
Clinique carcinologique	DARGENT
Anatomie pathologique	GUICHARD
Pathologie générale et expérimentale	GIRARD Paul
Anatomie	LATARJET
Pathologie chirurgicale	PEYCELON
Thérapeutique	GIRARD Marcel
Pathologie médicale	VACHON
Physio-Pathologie des voies respiratoires	GALY
Radiologie	PAPILLON
Clinique des maladies infectieuses	JEUNE
Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale	GONIN
Bactériologie	MONNET
Physiologie et pathologie obstétricales	BANSSILLON
Physiologie B	CHATONNET
Clinique endocrinologique	GUINET
Clinique de chirurgie orthopédique	TRILLAT
Clinique stomatologique	FREIDEL
Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles	MARION Joseph
Matière médicale et législation pharmaceutique	DORCHE
Histologie et embryologie	DUMONT Louis
Chimie	PERROT
Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire	PERRIN J.
Clinique médicale infantile et hygiène du premier âge	X...
Biologie médicale et pharmacodynamie	X...

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Physique nucléaire appliquée à la médecine	MM. BERGER
Bactériologie	BERTOYE
Neuro-chirurgie	MANSUY
Chimie pharmaceutique	COLLET
Clinique de pédiatrie	SARROUY
Climatologie	LACROIX
Clinique chirurgicale propédeutique	LIARAS
Neuro-chirurgie	LECUIRE
Médecine générale	REVOL
Thérapeutique chirurgicale	GOINARD

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Parasitologie	MM. ROMAN	Anatomie pathologique ..	FEROLDI
Pharmacie chimique et Pharmacologie	CIER André	Physique biologique	MORET

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

CREYSEL Roger
THIVOLET
GARIN
TOLOT
PINET
ODDOUX
DE SOLLIERS
LEJEUNE
REBOUILLAT
BUFFARD
NAUSSAC
ROMAGNY
DE MOURGUES F.
TOMMASI
RIFFAT
JOUVET
PEYRIN
DESPIERRES
GUYOTAT
DESCOTES

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES STAGIAIRES

MM. DUROUX
BRETTE
BOUCHET
FAVRE-GILLY
GIROD
GRAS
MALLEIN
RIFFAT
FAUCON
FLANDROIS
VIALIER-
RAYNARD

AGREGES EN EXERCICE

MM. BURTHIAULT
PONT
VIGNON
PLAUCHU
FRAEGER
DEVIC
GARDE
PERRIN André
LARBRE
MORNEX
NORMAND
FRIES
LAMBERT
NOEL Gilbert
ROBERT
MARION Pierre
MICHAUD
JAUBERT
DE BEAUJEU
SAUTOT
GUILLEMIN
DE MOURGUES G.
FRANCILLON
SAUBIER
MARET
MICHOULIER
DUMONT Martial
GARMIER
GIGNOUX
GAILLARD
FRANÇOIS
COLIN
SCHOTT
BONAMOUR
HUGONNIER
DURAND
CHASSARD
ALLEGRE
FAYSSE
SCHNEPP
KALB
DUMAS
COLOMB
BETHENOD

SAUTOT
GUILLEMIN
DE MOURGUES G.
FRANCILLON
SAUBIER
MARET
MICHOULIER
DUMONT Martial
GARMIER
GIGNOUX
GAILLARD
FRANÇOIS
COLIN
SCHOTT
BONAMOUR
HUGONNIER
DURAND
CHASSARD
ALLEGRE
FAYSE
SCHNEPP
KALB
DUMAS
COLOMB
BETHEND

Examineurs de Thèse : R. SOHIER, P. MONNET, M. BETHENOD, J. THIVOLET

**Diagnostic de la Pneumopathie dite « Atypique
Primitive » due au Mycoplasma Pneumoniae
(Agent d'Eaton)
par la Technique d'Immunofluorescence**

Travail du Laboratoire d'Hygiène de la Faculté Mixte de
Médecine et Pharmacie de LYON (Professeur SOHIER)

THÈSE

PRESENTÉE

A LA FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON
ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 18 DECEMBRE 1963
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MEDECINE

PAR

PICARD Jean-Paul

Ancien Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire

Né le 21 Février 1938 à HENDAYE (Basses-Pyrénées)



IMPRIMERIE JANODY
23, Cours Docteur-Long
LYON

1963



A LA MEMOIRE DE MES GRANDS PARENTS

A LA MEMOIRE DE MON PARRAIN

A LA MEMOIRE DE MON ONCLE

A MA GRAND-MERE

En témoignage de mon affection.

A MA MERE ET A MON PERE

Leur bonté, leur droiture et leur courage sont pour moi un exemple et je n'oublierai jamais leurs sacrifices.

Puisse ce travail leur apporter un gage de ma reconnaissance et de toute mon affection filiale.

Leur joie sera ma plus belle récompense.

A MA FIANCEE

A MA SŒUR

A MES FRERES

A TOUS LES MIENS

A TOUS MES CAMARADES

de l'Ecole du Service de Santé Militaire
de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie
des Colonies de Vacances P.E.P.

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur R. SOHIER

Membre correspondant de l'Académie de Médecine
Professeur d'Hygiène à la Faculté de Médecine de Lyon
Expert de l'O.M.S. pour les maladies à virus

Il nous a fait le grand honneur de nous accepter dans son laboratoire.

Il nous a fait confiance et nous a inspiré le sujet de cette thèse.

Nous avons pu apprécier la haute valeur de son enseignement et de ses qualités humaines et morales.

Il nous a communiqué son enthousiasme pour l'Hygiène et l'Epidémiologie auxquelles nous sommes destinés, et a affermi notre goût pour la recherche biologique.

Nous espérons pouvoir poursuivre ce travail sous sa haute direction.

Nous le remercions de sa bienveillance à notre égard et le prions d'accepter l'expression de notre respectueux attachement.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur P. MONNET

Professeur de Bactériologie à la Faculté de Médecine de Lyon

Nous le remercions de l'honneur
qu'il nous a fait en acceptant de
nous juger.

Hommages très respectueux.

Monsieur le Professeur Agrégé M. BETHENOD

Il nous a fait l'honneur de s'inté-
resser à nos recherches. Nous le re-
mercions d'avoir bien voulu juger
cette thèse.

Hommages respectueux.

A NOTRE MAITRE ET JUGE

Monsieur le Professeur Agrégé J. THIVOLET

Maître de Conférences - Agrégé d'Hygiène

Il nous a guidés pas à pas dans nos recherches en ne nous ménageant ni son temps, ni ses encouragements que nous avons tant appréciés.

Pendant les trois années passées auprès de lui nous avons bénéficié de son enseignement et de la vaste étendue de ses connaissances.

En toutes circonstances il a fait preuve de bienveillance à notre égard.

Nous le remercions vivement de la sympathie qu'il nous a témoignée et l'assurons de notre profond respect et de notre immense gratitude.

Que ce travail soit le premier gage de notre reconnaissance.

A Monsieur le Médecin-Général Inspecteur R. BORON

Professeur Agrégé du Val-de-Grâce
Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire
et de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes

A Monsieur le Médecin Colonel A. CAMELIN

Professeur Agrégé du Val-de-Grâce
Sous-Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire
Médecin-Chef de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes

A NOS MAITRES
DE LA FACULTE DE MEDECINE DE LYON
DES HOPITAUX CIVILS
DE L'HOPITAL MILITAIRE D'INSTRUCTION DESGENETTES

En particulier à :

Monsieur le Médecin Commandant FELIX

*Professeur Agrégé du Val-de-Grâce
Chef du Service de Médecine Générale
de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes*

Un semestre passé dans son service a été pour nous riche d'enseignements.

Il nous a fait l'honneur de s'intéresser à notre travail et par sa compréhension, nous a permis de le réaliser.

Qu'il trouve ici un témoignage de notre gratitude et de notre respectueuse admiration.

Monsieur le Médecin Commandant ROUMAGOUX

*Spécialiste des Hôpitaux de l'Armée
Chef du Service de Pneumo-phtisiologie
de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes*

En souvenir d'un excellent semestre passé dans son service, durant lequel il nous a initiés à la Pneumo-phtisiologie et ne nous a pas ménagé ses encouragements et ses conseils pour notre travail.

Nous sommes heureux de pouvoir lui exprimer ici toute notre reconnaissance.

A Messieurs les Médecins Capitaines
BADROUILLARD, GIROUD, JOLY et PIROLLET
Assistants des Hôpitaux Militaires

AU PERSONNEL
DE L'HOPITAL MILITAIRE D'INSTRUCTION DESGENETTES

A Madame le Docteur HENRY
ET
Mademoiselle le Docteur KRATCHKO

Qui nous ont initiés au travail de
laboratoire et dont les conseils nous
ont été précieux.

A TOUT LE PERSONNEL
DU LABORATOIRE D'HYGIENE DE LA FACULTE

Qui nous a toujours réservé un
accueil sympathique et nous a aidé
dans l'élaboration technique de ce
travail, en particulier :

Madame THAL

Qui a eu la charge d'effectuer la
plupart des inoculations.

Madame GRAMUSSET

Mesdemoiselles G. BLANC et M.-H. RICHARD

Très sincères remerciements.

Nous sommes très heureux de remercier vivement MM. les Docteurs B.-P. MARMION de Leeds (Grande-Bretagne) et J.-E. HERS de Leyden (Pays-Bas) pour leur aide et leurs conseils.

La technique que nous avons utilisée est très voisine de la leur.

Ce travail a été effectué avec l'aide substantielle de l'Institut National d'Hygiène (Professeur Bugnard) qui nous a permis, en particulier, l'acquisition du Microtome Young et du Cryostat Harris.

INTRODUCTION

Le rôle de l'Agent spécifique découvert par Eaton, en 1944, dans les pneumonies humaines dites « atypiques primitives », n'a été prouvé avec certitude que 13 ans plus tard, à la suite des constatations de Liu, par application des méthodes d'Immunofluorescence introduites par A.-H. Coons.

La véritable nature de ce microorganisme, classé dernièrement par Chanock dans le groupe des P.P.L.O. sous le nom de *Mycoplasma Pneumoniae*, n'est apparue qu'après un nouveau délai de 4 ans.

C'est en appliquant la méthode d'Immunofluorescence de Liu, la plus spécifique dans le diagnostic sérologique de la maladie de Eaton, que, en début 1962, nous avons entrepris cette étude afin de déterminer le rôle de l'agent de Eaton dans les Pneumopathies dites « Atypiques Primitives » accompagnées de la présence d'Héماغglutinines à froid, observées en France et plus spécialement dans notre région.

Ce travail qui nous a été confié par M. le Professeur Sohier et qui a été réalisé au Laboratoire d'Hygiène de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon, repose sur la recherche des anticorps fluorescents pour *Mycoplasma pneumoniae*, dans 270 sérums provenant de 169 malades différents, pendant les années 1962 et 1963.

Notre étude est en grande partie qualitative, mais rapporte cependant les résultats du titrage des sérums, en général couplés, de 20 malades.

Au sujet de la dénomination du microorganisme, nous utiliserons indistinctement, tout au long de ce modeste ouvrage, les termes de « Agent de Eaton », « *Mycoplasma Pneumoniae* », « *Mycoplasma* de Eaton », ou encore « PPLO Eaton ».

Nous étudierons successivement :

I. — L'Histoire de l'Infection par l'Agent de Eaton.

II. — La mise en œuvre de la réaction d'immunofluorescence et les résultats obtenus par les différents Auteurs.

III. — Notre apport personnel :

1. Réalisation de la technique.
2. Résultats sérologiques et cliniques.
3. Etude comparative des Hémagglutinines à froid et des Anticorps fluorescents pour l'agent de Eaton.
4. Problème particulier des Hémagglutinines à froid au cours des infections à Adénovirus.

IV. — Discussion.

HISTORIQUE

A) Découverte d'un « agent » spécifique dans le groupe des P.A.P.* avec H.A.F.**

Parmi les pneumonies « à virus » ou non bactériennes étudiées depuis 1930 par les auteurs américains, Reimann [60] isola, en 1938, à l'occasion de petites épidémies de plusieurs villes des Etats-Unis, un nouveau syndrome clinique décrit sous le nom de « Pneumonie Atypique » et groupant un nombre varié, dans leurs manifestations cliniques, d'affections respiratoires aiguës.

Les cliniciens, ainsi que les chercheurs, ont longtemps considéré que ce syndrome pouvait être causé par de nombreux agents étiologiques.

En effet, dans les années qui suivirent, cette entité clinique fut démembrée par l'identification d'agents étiologiques, tous de nature virale. Il s'agissait d'une part de virus nouvellement connus tels le virus infectant spontanément la souris et pouvant être apparenté au virus de la P.A.P. humaine (Horsfall) [37], le groupe des virus isolés de chats malades par Baker [1] et les virus étudiés par Rose et coll. [61] et inoculables au cobaye. D'autre part et surtout la preuve du rôle de certains virus, anciennement connus, dans les P.A.P. était apportée par :

— Van Royen et Rhodes [76], Bedson [2] et Stuart-Harris [70] entre autres pour les virus grippaux ;

— Smadel [63], en 1943, pour les virus du groupe Ornithose-Psittacose ;

— Dyers [19], en 1940, pour la rickettsiose dite fièvre Q ;

— Smadel et Collaborateurs, en 1942, pour le virus de la chorio-méningite lymphocytaire [62].

(*) Lire désormais pour P.A.P. : Pneumopathie Atypique Primitive.

(**) Lire désormais pour H.A.F. : Hémagglutinines à Froid.

— Enfin, la découverte, en 1953, par Rowe et Huebner des adénovirus, ouvrait un nouveau chapitre de la virologie et ainsi de la pathologie broncho-pulmonaire puisque Hilleman [36], Huebner [38], Dascomb [18], puis Sohler [65, 67, 69] mettaient en évidence le rôle des Adénovirus (principalement les types 4, 7 et 7') dans l'étiologie des pneumopathies aiguës.

Seule demeurait mystérieuse la cause de la pneumonie « primitive » cliniquement atypique et que l'on trouvait depuis les travaux de la Commission on Acute Respiratory Disease [15] de Peterson [58] et de Turner [75] en 1943, associée à un syndrome biologique consistant en la présence dans le sang des malades, d'Hémagglutinines à Froid et avec une fréquence moindre d'Agglutinines pour le Streptocoque MG (Thomas) [74].

Et c'est dans le cadre des études sur l'étiologie du groupe des P.A.P. avec H.A.F. que, après un échec d'isolement par la Commission on Acute Respiratory Disease [15 bis], Eaton, Meiklejohn et Van Merick [20] isolaient, en 1944, un agent filtrable spécifique pathogène par voie nasale pour le rat du coton (*Sigmodon Hispidus Hispidus*). Cet agent était en même temps reconnu pathogène pour le Hamster et la mangouste respectivement par Johnson et coll. [40] et Weir et Horsfall [77] mais ces auteurs n'avaient pas obtenu de résultats convaincants dans leurs tentatives de passage sur ces animaux.

L'Agent isolé par Eaton et Coll. à partir de l'expectoration de malades atteints de P.A.P. était également reconnu par ces auteurs, pathogène pour les Hamsters et les embryons de poulets [20].

Les suspensions de tissu pulmonaire d'embryons de poulets inoculés par voie intra-amniotique avec des produits pathologiques humains (crachats) filtrés, provoquaient chez le rat du coton et les Hamsters inoculés par voie intranasale, des lésions pulmonaires similaires à celles observées chez ces mêmes animaux après l'instillation directe de produits infectés de même origine.

Enfin et surtout l'agent d'Eaton était spécifiquement neutralisable par les sérums de convalescents de P.A.P. [22].

Ce « virus » se présentait avec une taille de 180 à 250 μ , une thermolabilité et un pouvoir infectant assez faible vis-à-vis

des animaux utilisés qui diminuait rapidement par conservation prolongée à -70°C dans des tubes de verre non scellés [21].

Cependant, malgré l'isolement du virus et la preuve donnée par Eaton, d'après les résultats d'expériences sur Hamsters et rats du coton, de l'apparition chez l'homme d'anticorps neutralisants, le rôle pathogène de ce virus dans le groupe des P.A.P. avec H.A.F. fut discuté et même controversé pendant encore 13 ans, en raison de l'échec de nombreux essais d'isolement, de la difficulté de mettre en œuvre un test sérologique reproductible et en raison du risque d'erreur dû à la présence possible d'un virus hébergé par les rongeurs avant leur inoculation et à son activation par un agent lors du passage sur embryons de poulets.

Dès 1945, Eaton et Coll. infirmaient cette dernière hypothèse en décrivant les échecs des tests de neutralisation de trois virus respiratoires communs chez les animaux étudiés : les virus de la Pneumonie des hamsters et des souris, l'Agent W2 et l'Agent W3 trouvé chez les rats du coton [22].

Ils prouvaient ainsi la spécificité de la réaction de neutralisation pour le « virus » de la P.A.P.

B) Cultures

1° ANIMAUX.

L'Agent de Eaton fut donc d'abord transmis sur les rongeurs, mais du fait de la variété limitée des hôtes sensibles, cette culture ne s'effectua plus que sur les œufs embryonnés, par inoculation intra-amniotique. Le passage sur rats du coton et Hamsters n'était utilisé que comme test d'infection de l'embryon de poulet puisque sur ce même embryon aucune lésion ne pouvait être décelée. Eaton avait montré que les meilleures conditions de culture étaient réalisées par l'inoculation intra-amniotique et non dans les sacs vitellin ou allantoïdien, d'un œuf de 11 jours et par une incubation longue de 7 à 9 jours en moyenne [21].

La culture sur œufs fut poursuivie (avec la souche Mac, isolée en 1944 par Eaton) et, 12 ans plus tard, en utilisant une variante de la méthode d'immunofluorescence de Coons et

Kaplan [17], Chien Liu, en 1957 [48], permettait l'isolement du « virus de la P.A.P. » cultivé sur l'embryon de poulet en identifiant l'antigène spécifique localisé sur l'épithélium bronchique.

Liu ne détectait d'antigène ni sur la partie supérieure de la trachée, ni sur les parabronches, ni sur la membrane amniotique, les gros vaisseaux, le cœur et l'appareil digestif [45].

Les poumons ne présentaient pas de lésions macroscopiques ni microscopiques et il n'existait pas de différence entre les embryons normaux et infectés [48].

La découverte de Liu vérifiait l'hypothèse déjà ancienne de Eaton [21] selon laquelle la croissance du « virus » s'effectuait sur les voies respiratoires de l'embryon de poulet. Elle représentait en même temps un nouveau test d'infection, supprimant la nécessité de l'inoculation aux hamsters et rats du coton dans l'épithélium bronchique desquels Liu ne trouvait pas d'antigène décelable par immuno-fluorescence [48].

L'agent localisé par Liu était spécifique, puisque 8 nouvelles souches isolées par lui, à partir de malades de P.A.P., étaient antigénétiquement reliées sinon identiques à la souche Mac isolée par Eaton, alors que le même agent ne présentait aucune relation antigénique avec les virus de la psittacose, les rickettsies (fièvre Q), les adénovirus (types 1 à 6) et les virus grippaux A et B [47] [48].

Chien Liu, et par la suite un certain nombre d'auteurs, appliquaient à l'Agent de Eaton de la P.A.P. la désignation de *virus* bien que, au cours de la décennie qui suivit son premier isolement les recherches d'Eaton et Coll. aient montré que, tout en étant filtrable, cet agent était relativement grand (180-250 μ), et que ses souches étaient résistantes à la pénicilline et, par contre, sensibles de façon générale aux Tétracyclines et de façon plus variable à la Streptomycine [21-26].

2° CELLULES.

L'obtention par Chanock et Coll., en 1960 [5] [32], de la multiplication sur cultures de tissus pouvait confirmer la notion de la nature virale de l'Agent de Eaton. Ce dernier poussait sur cultures de reins de poulet, sur H.E.P. - 2, sur cultures d'en-

toderme de poussin, et sur cultures de rein de singe Rhésus, lesquelles permettaient de plus l'isolement de 14 nouvelles souches. Les essais de ces auteurs de détection de l'antigène par immunofluorescence sur cultures de cellules n'ont pas abouti.

Mais la nature virale de l'Agent de Eaton ou « virus » de la P.A.P. était remise en question quelque temps après, en 1961, par Marmion [52]), qui constatait que ce microorganisme était sensible à un sel d'or organique (aurothiomalate de sodium) inhibant la poussée de l'agent sur embryons de poulets et hamsters, propriété caractéristique des organismes voisins de l'agent de la pleuropneumonie (P.P.L.O.) [43 et 56], appelé actuellement « Mycoplasma », alors que les virus (grippe, vaccine, variole, groupe de la Psittacose) de taille analogue sont insensibles à ce sel d'or.

Quelque temps après, Marmion et Goodburn [29-30] publiaient la découverte d'organismes coccobacillaires dans des poumons d'embryons de poulets infectés par le virus de la P.A.P. Ils les appelaient des « corps élémentaires » (E.B.) et les localisaient, par la méthode de Giemsa intensifiée, au même endroit sur l'épithélium mésobronchique qu'occupe l'antigène spécifique, visualisé par immunofluorescence.

Les données sur la nature de l'Agent de Eaton de la P.A.P. se complétèrent par les observations de Clyde [13] sur cultures de cellules de rein de singe infectées par l'Agent de Eaton, révélant des formations extracellulaires ressemblant à des colonies d'un diamètre moyen de 10 μ , formations du type du Mycoplasma. Au contraire de Chanock, Clyde réussit, de plus, à mettre en évidence, sur cellules, l'Agent de Eaton par la méthode d'immunofluorescence.

Cette donnée nouvelle a permis de supposer que l'organisme était plus proche du Mycoplasma que des virus.

3° MILIEU SOLIDE AGAR - P.P.L.O.

Enfin, c'est à Chanock et Coll. [8-9] que revient le mérite d'avoir mis en œuvre récemment, en 1962, un dernier procédé de culture de l'Agent de Eaton par l'obtention de la croissance d'une souche standard sur un milieu solide acellulaire. Le milieu utilisé était un milieu spécial pour mycoplasma et com-

posé d'Agar Difco-P.P.L.O., contenant 20 % de sérum de cheval inactivé et 10 % d'extrait de levure du boulanger à 25 %. La culture se manifeste par la présence de colonies arrondies de 20 à 100 μ de diamètre, d'aspect granuleux homogène et dont le centre est inclus dans l'agar, ces caractéristiques étant propres aux mycoplasma [43].

On a pu démontrer par les tests d'immunofluorescence, en utilisant des sérums de malades de P.A.P. en phases aiguë et de convalescence, que l'agent est d'une spécificité antigénique totale et que les souches sont identiques à celles isolées sur l'œuf. A l'heure actuelle, au moins 30 nouvelles souches naturelles ont pu être isolées directement sur ce milieu à partir de lavages de gorge des malades atteints de P.A.P. « Eaton » sérologiquement confirmées (par immunofluorescence) [9]. L'efficacité de cette méthode d'isolement semble supérieure aux méthodes de culture sur œufs ou sur tissus (cellules) (Chanock) [56].

Les propriétés antérieurement définies de l'Agent (taille, sensibilité aux antibiotiques et en particulier à la déméthylchlorotétracycline [52], inhibition par l'aurothiomalate, corps coccobacillaires), et sa culture avec succès sur Agar P.P.L.O. permettent d'affirmer qu'il s'agit d'un Mycoplasma.

De nombreux passages sur milieux sans antibiotiques indiquent qu'il ne représente probablement pas une forme L de Bactérie, puisqu'on n'obtient jamais ainsi le retour à une forme bactérienne figurée [8]. Ainsi, après vingt ans de recherches, est-on arrivé à connaître la nature exacte de cet organisme qu'on trouvait associé au groupe de la P.A.P. avec H.A.F. [34].

Le « virus de la P.A.P. » du début ou « l'Agent de Eaton de la P.A.P. » de la période de transition, n'est pas un virus mais un membre du genre Mycoplasma (P.P.L.O.) [43], et tout récemment Chanock l'a dénommé : *Mycoplasma Pneumoniae* [11]. Il l'a classé comme une espèce distincte du genre Mycoplasma, dont il est bon de rappeler que le prototype est Mycoplasma Mycoïdes, agent de la péripneumonie bovine, isolé en 1898 par Nocard et Roux [55] sur sacs de collodion ou de roseau inserrés dans le péritoine de lapin et cultivé par eux sur bouillon-peptone additionné de 20 % de sérum de vache.

C'est la première fois que l'on trouve un organisme du type des P.P.L.O. associé à une maladie de l'appareil respi-

ratoire chez l'homme, mais l'accord n'est pas fait sur le rôle exact du *Mycoplasma* dans le déterminisme des pneumopathies à partir desquelles il a été isolé, car il n'a pas été possible de provoquer une maladie chez l'homme inoculé par voie nasale avec les cultures de *Mycoplasma* isolées sur milieu inerte alors que les cultures de l'Agent de Eaton sur cellules de rein de singe inoculées à des volontaires provoquaient des pneumopathies et des bronchites aiguës et une myringite bulleuse (d'après Couch et Coll., à paraître) [56].

Cependant, cette inoculation de culture de P.P.L.O. fait apparaître une augmentation des anticorps fluorescents pour l'Agent de Eaton et des H.A.F. [9 et 56].

C) Mise au point d'une réaction sérologique

Bien que la nature exacte de l'Agent de Eaton n'ait été élucidée que 17 ans après son isolement, il a toujours été possible de connaître le rôle de ce microorganisme dans les P.A.P. ou infections variées de l'appareil respiratoire de l'homme avec H.A.F. grâce aux réactions sérologiques.

De Eaton, qui donna la preuve de l'apparition chez l'homme d'A.C. neutralisants, à Chanock ayant mis en œuvre récemment une réaction de fixation du Complément, en passant par Liu qui, par les méthodes d'immunofluorescence, démontra le rôle de l'Agent de Eaton chez l'homme, en même temps qu'il localisait l'Agent sur l'épithélium bronchique des embryons de poulets infectés, les méthodes sérologiques se sont simplifiées, sont devenues plus reproductibles et plus précises et permettent de plus larges investigations immuno-épidémiologiques.

1° ANTICORPS NEUTRALISANTS.

C'est donc Eaton [22], qui, à la suite de l'isolement de l'Agent associé à la P.A.P., mit en œuvre le premier test sérologique d'infection, en montrant le développement d'anticorps neutralisants spécifiques dans les sérums de malades de P.A.P., par épreuve sur les hamsters et rats du coton inoculés par voie intranasale avec une suspension du « virus » cultivé sur embryons de poulets. Les sérums « précoce » et tardif,

chauffés à $+ 56^{\circ}\text{C}$ pendant 20 minutes, étaient dilués en sérum de cheval normal et mélangés à part égale avec la suspension virale. Après incubation du mélange à la température ambiante pendant 20 minutes, trois ou quatre rongeurs étaient inoculés. Ils étaient sacrifiés 8 à 10 jours après inoculation et leurs poumons prélevés. La lecture du test se faisait par le décompte des lésions pulmonaires macroscopiques. Lors des titrages, la limite était représentée par la dilution finale la plus élevée, prévenant l'apparition des lésions pulmonaires macroscopiques chez l'animal.

Sur 69 malades étudiés, ayant présenté une P.A.P. cliniquement confirmée, Eaton trouvait une montée d'anticorps neutralisants significative chez 61 % des malades, alors que 10 % présentaient des titres d'A.C. stables sans, augmentation notable.

Par ailleurs, il démontrait que la présence d'H.A.F. et d'Agglutinines pour un Streptocoque n'était pas spécifique de la maladie puisque ces deux réactions n'étaient trouvées positives que chez 50 % des malades de P.A.P., avec montée d'anticorps neutralisants.

Enfin, les sérums de pneumonies virales dues à la grippe A et la Psittacose, ou bactériennes, se révélaient incapables à provoquer une montée significative de ces anticorps neutralisants. C'était également le cas des infections dues à trois virus respiratoires des Hamsters et Rats du coton (P.M.V. - W2 et W3).

2° IMMUNOFLUORESCENCE.

Nous étudierons dans un autre chapitre, puisque telle est l'orientation de notre travail, la mise en œuvre de la réaction d'Immunofluorescence, dérivée de la technique de Coons et Kaplan [17], et appliquée par Chien Liu, en 1957, au diagnostic de la pneumopathie de Eaton, diagnostic direct d'une part, par isolement du « virus » responsable, et sérologique d'autre part, sur coupes de poumon d'embryons de poulets inoculés respectivement, soit avec du matériel humain infecté, soit avec une souche déjà isolée et connue [45 et 47-49].

Il est bon de rappeler également que la réaction d'I.F. a été appliquée avec succès directement sur cultures de cel-

lules de rein de singe et sur milieu solide acellulaire, respectivement par Clyde [13] et Chanock [8] dans le diagnostic biologique de l'infection par l'agent de Eaton.

3° FIXATION DU COMPLÉMENT.

La réaction de *fixation du complément*, décrite par Chanock [10] en 1962, semble un peu moins sensible que la réaction d'immunofluorescence, puisque 80 % seulement des tests positifs par cette dernière méthode ont donné des résultats positifs lors de la fixation du complément [10 et 56].

Chanock a pu produire un Antigène fixateur du complément en utilisant un bouillon de culture du microorganisme que l'on fait incuber avant l'apparition du taux maximum.

Le test de fixation du complément est effectué avec 8 unités d'Antigène et 2 unités entières du complément ; le mélange sérum-Antigène est incubé pendant une nuit à + 4°C.

La spécificité de la réaction est admise puisque l'augmentation des taux d'anticorps des sérums couplés n'a été observée que dans les cas où la coloration au fluor avait déjà mis en évidence une telle montée.

MISE EN ŒUVRE DE LA METHODE D'I.F.* SUR LES COUPES DE POUMONS D'EMBRYONS DE POULETS

A) Mise en œuvre technique de la littérature

Le diagnostic de la Pneumopathie Atypique « primitive » a longtemps reposé sur des faits cliniques et images radiologiques et sur un test sérologique, le développement des H.A.F. et/ou des agglutinines anti-streptocoque M.G. dans le sérum des convalescents. Mais il n'existait pas de diagnostic spécifique.

Le grand mérite revient donc à Liu [48-49] qui, en 1957, en appliquant la technique d'Immunofluorescence, a permis en même temps que l'isolement et l'identification du « virus » pendant la phase aiguë, la réalisation d'un test sérologique spécifique de la maladie due à l'agent isolé par Eaton en 1944.

La recherche des anticorps fluorescents produits au cours de l'infection due à l'Agent de Eaton, est une application de la méthode indirecte de Coons [17], en utilisant comme antigène des coupes histologiques de poumons d'embryons de poulets infectés par ce microorganisme. Nous étudierons en détail la technique de Liu et, par la suite, envisagerons les variantes apportées par les différents auteurs à cette méthode.

1° TECHNIQUE MISE AU POINT PAR LIU EN 1957 [48].

a) Matériel.

L'Antigène :

Il est représenté par des coupes de poumon d'embryons de poulets inoculés à 13 jours par voie intraamniotique avec la souche Mac du « virus » P.A.P., isolée en 1944 à partir de tissu pulmonaire humain, par Eaton [20].

(*) Lire désormais pour I.F. : Immunofluorescence.

L'inoculation sur œufs de 13 jours donne de meilleurs résultats que celle sur œufs de 10 jours effectuée par Eaton pour les passages successifs de la souche.

Chaque œuf reçoit 0,2 ml de suspension virale. Après incubation à + 35°C pendant 5 à 6 jours, les poumons d'embryons, ainsi que les bronches et la partie basse de la trachée, sont prélevés sans refroidissement préalable des œufs. Après contrôle de stérilité sur gelose au sang, une partie des poumons est mélangée et broyée au mortier dans un bouillon nutritif, contenant 1 % d'albumine bovine, à raison de 2 ml par paire de poumons ; la suspension finale, estimée à 10 % (1 part de tissu pulmonaire infecté + 9 parts de diluant), est répartie en petites quantités dans des ampoules scellées, congelées et conservées à — 70°C.

Le test de l'activité virale était effectué sur coupes de 2 à 3 poumons lors de chaque passage avec un sérum de convalescent connu pour son titre élevé d'anticorps anti-agent de Eaton et, d'après Liu, 90 % des poumons étaient infectés.

On n'utilisait, pour le titrage d'anticorps dans de nouveaux sérums, que les poumons montrant une fluorescence intense en plusieurs foyers [49].

Les coupes doivent comprendre le poumon, les bronches et la partie basse de la trachée représentant, d'après Liu, le lieu unique de multiplication du « virus » sur l'embryon.

Les poumons sont congelés après leur prélèvement dans un mélange de neige carbonique + éthanol et des coupes de 4 à 5 μ sont effectuées au microtome placé à — 20°C dans un cryostat. Liu effectuait 200 à 300 coupes avec le même poumon. Les coupes sont fixées dans l'acétone pendant 10 minutes et séchées à l'étuve à + 37°C pendant 20 minutes, puis conservées à + 4°C pour une durée inférieure à une semaine ou à — 20°C pour une durée supérieure.

Sérums :

Ce sont des sérums de malades de P.A.P. avec H.A.F. en général. On devra disposer de 2 sérums : l'un « précoce », prélevé pendant la phase aiguë avant le 7^e jour de la maladie, et l'autre « tardif », prélevé à partir du 15^e ou 20^e jour après ce

début. Tous les sérums étaient inactivés à $+ 56^{\circ}\text{C}$ pendant 30 minutes, puis dilués par la méthode des dilutions successives de raison 2, la dilution de départ étant 1/10 dans du sérum humain frais, n'ayant pas d'anticorps fluorescents ou du sérum de cobaye frais, les deux étant dilués à 1/10 en tampon véronal avant d'être utilisés comme diluants. Liu a montré en effet, en 1960, que le sérum humain normal frais et le sérum de cobaye frais contenaient un facteur favorisant la réaction immunologique intervenant dans le phénomène d'I.F. [50].

Préparation du « conjugué » sérum anti-globuline humaine et isothiocyanate de fluorescéine

Le sérum antiglobuline humaine était préparé en immunisant des lapins avec la fraction II de plasma humain, en utilisant l'antigène précipité par l'alun adsorbé sur hydroxyde d'aluminium.

Puis ce sérum était précipité par une solution de sulfate d'ammonium saturé et marqué avec l'isothiocyanate de fluorescéine, suivant la méthode de Coons et Kaplan.

Avant leur utilisation pour la réaction d'I.F., les conjugués étaient absorbés une à deux fois sur poudre de foie de souris pour éliminer la fluorescence non spécifique.

b) Technique.

Liu utilisa la méthode indirecte ou en « sandwich », qui est plus sensible et qui, à la différence de la méthode directe, donne une fluorescence spécifique plus nette et plus intense.

On utilise donc des coupes de poumons d'embryons de poulets infectés et des sérums dilués, soit pour un « screening-test », soit pour des titrages d'anticorps. Pour plus d'exactitude dans les résultats, les sérums « précoce » et « tardif » d'un malade étaient testés le même jour avec des coupes successives du même poumon.

On peut introduire dans les réactions des témoins de

contrôle :

- poumon non infecté + sérum positif ;
- poumon infecté + sérum négatif ;
- poumon infecté + diluant seul ;
- poumon infecté + conjugué seul.

La technique comprend deux temps de manipulations et un troisième de lecture.

Le premier temps consiste en un « contact-sérum » = une goutte de chaque sérum dilué est respectivement déposée sur une coupe de poumon et laissée en contact pendant 30 minutes à la température du Laboratoire.

Après quoi on rince et on lave dans une solution saline tamponnée à pH 7,4 pendant 10 minutes, on essuie ensuite les lames, sauf au niveau de la coupe histologique.

Le deuxième temps est un « contact-conjugué » = une goutte de « conjugué » est déposée sur la coupe et le temps de contact est également de 30 minutes à la température du laboratoire.

On lave à nouveau 10 minutes, on sèche et on monte la préparation en déposant sur la lamelle couvre-objet une goutte de glycérine tamponnée pH 7.

Enfin, le dernier temps consiste à examiner les coupes le plus rapidement possible au microscope, avec système optique spécial et rayonnement U.V.

L'intensité de la fluorescence spécifique sur l'épithélium bronchique de l'embryon se note en croix de + à ++++ de façon très empirique. Dans les titrages d'anticorps, le taux limite sera déterminé par la dilution supérieure donnant une fluorescence à une croix. On considère comme négatifs les sérums qui, dilués à 1/10, ne donnent aucune fluorescence.

Donc, la technique de Liu a présidé à la mise en œuvre d'un test sérodiagnostique spécifique de la « P.A.P. de Eaton », tout en permettant l'isolement du « virus » n'ayant aucune parenté antigénique avec les agents de la Psittacose, la Fièvre Q, la grippe A et B et les Adénovirus (types 1 à 6) et dont les différentes souches sont antigéniquement semblables les unes aux autres [48].

2° CHEZ LES AUTRES AUTEURS.

D'autres auteurs par la suite, la plupart anglo-saxons, et dernièrement les Hollandais, ont appliqué la méthode de Liu pour le diagnostic de la Pneumopathie « A.P. » due à l'agent de Eaton, tout en y apportant quelques variantes.

Chanock et ses Coll. [4 et 6, 7] (dont principalement M. K. Cook) [16] employaient lors de l'inoculation une dilution à 1/5 de suspension de poumons d'embryons de poulets infectés, cette suspension ainsi que les dilutions à 1/5 étant effectuées en trypticase soy-broth, additionné de 0,5 % d'albumine bovine et 2.000 de pénicilline/ml.

En outre, ils sélectionnaient pour le « screening-test » de sérums, les poumons donnant :

a) au moins 2 foyers positifs de fluorescence maxima (++++) par coupe, avec une dilution à 1/40 de sérum de convalescent de P.A.P. de haut titre ;

b) au moins 1 foyer fluorescent, avec une dilution à 1/320 ou 1/640 du même sérum.

En outre, leur technique de la réaction I.F. différait par :

- 1° les dilutions de sérum effectuées en sérum de cobaye normal frais dilué à 1/10 en solution saline tamponnée à pH 7 par le Barbitol ;
- 2° les temps des contacts durant toujours 30 minutes mais s'effectuant à + 37°C *en chambre humide* ;
- 3° par ailleurs, les conjugués étaient absorbés 2 fois sur poudre de foie de singe et 2 fois sur poudre de foie de poulet, poudres extraites par l'acétone. La préparation de ces mêmes conjugués différait également de celle de Liu, puisque les sérums antiglobulines humaines étaient préparés en immunisant des lapins par injections intradermiques périodiques de mélange de globulines humaines et d'adjuvant de Freund (par la suite, ils utilisèrent des sérums antiglobulines humaines de chèvre et de cheval).

Le marquage se faisait en mélangeant le sérum à une solution saline tamponnée à pH 7 par le phosphate, puis en refroidissant, en ajustant le pH à 9 et enfin en ajoutant l'isothiocyanate de fluorescéine. Le mélange ainsi réalisé était agité

à + 4°C pendant 12 à 13 heures, puis dialysé contre une solution saline tamponnée à pH 7, pendant 2 à 3 jours.

Enfin, Chanock définissait une montée d'anticorps quadruple comme étant significative d'une infection récente.

De plus, Cook précisait que 20 à 25 % seulement des « pools » de poumons d'embryons étaient capables de provoquer une infection chez l'embryon de poulet inoculé et dans chaque lot le nombre de poumons positifs était très variable [16].

Clyde [12 et 14] utilisait en même temps une technique très voisine de celle de Liu : les œufs étaient inoculés à 14 jours avec une suspension virale diluée à 1/5 en bouillon d'infusion de cœur et de cerveau (Difco), additionné de 1 % d'albumine bovine (Armour) et de 1.000 u. de pénicilline x ml.

Le sérum antiglobuline humaine était préparé en immunisant des chèvres, et le conjugué était absorbé une fois sur poudre de poumons d'embryons de poulets et une fois sur poudre de poumons de poulets adultes, poudres extraites par l'acétone.

Par ailleurs, sa technique de la réaction était identique à celle de Liu.

Une dernière mise au point, très intéressante, de la technique, en 1962, par Goodburn et Marmion [29], utilisant depuis 1960 [51] la méthode d'I.F. dans le diagnostic de la P.A.P. de Eaton, nous a été d'une très grande utilité dans l'élaboration de notre travail.

Ils précisent la nécessité d'utiliser des souches constamment passées sur poumons d'embryons de poulets, car celles cultivées sur milieux solides acellulaires donnent sur les poumons des lésions moins localisées aux bronches, plus diffuses, donc moins facilement localisables en I.F.

En outre, ils insistent sur la nécessité de conserver les souches en ampoules scellées, congelées dans le mélange alcool-neige carbonique et placées à — 60°C.

Par ailleurs ils utilisent, pour les suspensions de poumons infectés et les dilutions d'inoculation, « l'E.O. diluent », composé de Tryptose-phosphate-Broth (Difco) stérile, additionné de 1 % d'albumine bovine, fraction V (Armour) (inactivée une

heure à + 56°C), de 0,3 % de gélatine (Oxoïd) et de 1.000 u. de pénicilline x ml.

L'inoculation s'effectue sur œufs de 13 jours, toujours par voie intraamniotique mais sous vision directe à travers le sac à air. Chaque œuf reçoit 0,2 ml de la suspension antigénique et est incubé à + 35°C pendant 6 ou 7 jours suivant le degré de virulence des souches.

Le prélèvement se fait sur œufs près d'éclore. Ces auteurs obtiennent 20 % d'œufs morts et 70 à 80 % de poumons positifs, donc les déchets sont faibles.

De plus, les sérums dilués en sérum de cobaye frais, dilué à 1/10 en sérum physiologique, sont absorbés deux fois sur poudres de foies de souris et de poumons d'embryons de poulets, extraites par l'acétone. De même, les conjugués dilués sont absorbés 2 fois sur poudres de foies et une fois sur char-coal activé (5 mg x ml).

La technique de la réaction diffère enfin par le premier temps de contact-sérum, s'effectuant pendant 60 *minutes* à + 37°C en atmosphère humide.

Avec cette méthode, les auteurs obtiennent un parenchyme parfaitement sombre et sans fluorescence non spécifique, et par contre une intense fluorescence spécifique localisée aux cellules épithéliales des mésobronches et, plus rarement, en petites taches sur les parabronches.

Hers, à Leyden, emploie une technique très proche de celle de Marmion (poudres d'absorption extraites par « freeze-drying ») [34-35].

B) Résultats de la littérature

La technique d'immunofluorescence a permis de montrer nettement un lien entre l'infection par « l'Agent P.A.P. » et la pneumopathie ou d'autres affections de l'appareil respiratoire chez l'homme.

Le rôle de l'Agent de Eaton a été ainsi démontré aux Etats-Unis par plusieurs auteurs dans certaines populations militaires, scolaires et universitaires, depuis les premières

études de Liu.

En Europe, par contre, la preuve du rôle de l'agent de Eaton dans les P.A.P. n'a été établie que plus récemment et uniquement en Grande-Bretagne et aux Pays-Bas.

Parmi trois groupes étudiés, représentant 89 malades atteints de pneumonie non bactérienne, Liu a trouvé 67 à 90 % de malades ayant élaboré des anticorps fluorescents pour le « virus » de Eaton [49]. Le groupe ayant donné un résultat positif à 90 % consistait en des malades d'une des trois épidémies de pneumonie dans une école de garçons. Etudiant la corrélation entre les anticorps spécifiques et les H.A.F., Liu trouvait 80 à 85 % de sérums révélant la présence d'anticorps fluorescents parmi les malades ayant une P.A.P. avec H.A.F.

Par contre, parmi les malades ayant présenté une infection par l'agent de Eaton, prouvée par l'immunofluorescence, 57 % seulement avaient développé en même temps des H.A.F.

Liu a étudié également l'évolution des anticorps fluorescents pour l'Agent de Eaton et a montré que leur taux est maximum à la 2^e ou 3^e semaine après le début de la maladie et qu'ils persistent pendant plus d'un an [49].

Les observations de Liu ont été confirmées par Chanock et Coll. Lors d'une première étude [4], Chanock a montré que 10 % des nourrissons et des petits enfants admis dans un hôpital de Washington pour affection broncho-pulmonaire présentaient les signes sérologiques de l'infection mis en évidence par l'immunofluorescence. En effet, 16 % d'enfants présentant une affection des « voies respiratoires inférieures » et non infectés par les virus grippaux, et para-influenzae, ni par les adénovirus, présentaient une montée d'anticorps pour l'Agent de Eaton.

Un deuxième groupe, étudié en même temps, d'enfants atteints de maladies de cause variée, sans relation avec une pneumopathie, ne révélaient pas, dans leur sérum, la présence d'anticorps.

Lors d'une enquête médicale, effectuée dans une base d'entraînement de la marine [6], 61 % des 238 cas de pneumonie et 28 % des 144 malades présentant d'autres affections respiratoires fébriles ont été reconnus atteints d'infection par l'agent de Eaton et, à cette occasion, 14 nouvelles souches ont

été isolées. Chanock montrait, par ailleurs, que, sur 30 cas d'infections par l'agent « P.A.P. Eaton », un seul se manifestait par une pneumopathie cliniquement typique.

Enfin, 36 à 44 % de malades infectés par le « virus » montraient une réaction positive pour les H.A.F.

Une enquête, portant sur des sérums conservés, a révélé que l'infection existait aux Etats-Unis depuis 1947 dans des régions géographiques différentes. Dans cette enquête, M.-K. Cook [16] montrait que 85 % des malades de P.A.P. avec H.A.F. avaient une montée d'anticorps fluorescents pour le « virus de Eaton », alors qu'elle ne trouvait que 26 % de malades de P.A.P., mais sans H.A.F., infectés par le même agent. Selon M.-K. Cook, l'infection par l'agent de Eaton était plus fréquente chez les sujets de 20 à 30 ans et, par ailleurs, n'était pas influencée par les saisons.

A la même époque, Clyde [12 et 14] testait les sérums conservés par la « Commission on Acute Respiratory Diseases » depuis 1944 [15] et trouvait 83 % de réactions d'immunofluorescence pour l'Agent de Eaton positives parmi les malades présentant des H.A.F. dans leurs sérums. Le « virus » de Eaton était reconnu responsable de 64 % des P.A.P. et de 70 % des affections respiratoires banales.

Récemment, une enquête a été menée pendant 8 ans sur les affections respiratoires parmi les étudiants des universités : 24 % des 119 cas d'infection broncho-pulmonaire ont été reconnus sérologiquement atteints par l'agent de Eaton [28].

Ces faits montrent donc que des infections présentant des organismes de même type antigénique ont existé aux Etats-Unis dès le début des années 40.

En appliquant les résultats trouvés parmi les militaires au reste de la population on peut estimer, d'après Kingston [42], le nombre de cas de pneumonie à Agent de Eaton, au double du nombre de P.A.P. avec H.A.F. En effet, dans toutes les études faites aux Etats-Unis, on trouve que plus de 80 % des sujets possédant des H.A.F. ont produit des anticorps spécifiques, mais que 50 % seulement des sujets présentant des anticorps spécifiques ont élaboré des H.A.F. Il y a cependant une exception à cette règle, puisque Evans et

Brobst [28] ont trouvé que les étudiants atteints de pneumonie produisaient plus souvent des H.A.F. que des anticorps spécifiques.

En Grande-Bretagne, bien qu'aucune enquête n'ait été effectuée dans l'ensemble de la population, il a été trouvé cependant, lors des prélèvements de routine, environ 80 cas [51 et 56] d'affections respiratoires présentant des anticorps pour l'Agent de Eaton, ce qui permet d'établir la présence de l'infection dans ce pays. De plus, des tests pratiqués sur « pools » de sérums lyophilisés de malades atteints de pneumonie, avec agglutinines antistreptocoque M.G., ont montré que l'infection existe depuis 1951 au moins [31].

Les cas étaient sporadiques ou apparaissaient sous forme de petites épidémies familiales ou scolaires, et le tableau clinique ressemblait généralement à celui décrit par les auteurs américains [31 et 59].

Aux Pays-Bas, Hers et Coll, ont étudié 130 cas dans la population générale et une centaine de cas à l'armée [34 et 35].

Quatre-vingts cas appartenaient à une seule épidémie, qui a atteint des enfants et des adultes entre 25 et 50 ans.

Dans les camps militaires, 70 % des pneumonies et 20 % des autres infections broncho-pulmonaires étaient associées à l'Agent de Eaton.

Au cours de ces études, cinq souches ont pu être isolées en tout : quatre provenant de produits d'expectoration et une d'un exsudat nasal.

Enfin, en France, sur 25 sérums testés par Liu, Boucher [3], en 1957, trouvait 20 % de malades militaires infectés par l'Agent de Eaton.

APPORT PERSONNEL

Les auteurs américains d'abord, puis anglais et hollandais, ayant nettement mis en évidence l'existence d'une relation étiologique entre l'agent isolé par Eaton en 1944 et la pneumonie atypique et d'autres infections de l'appareil respiratoire chez l'homme, il était intéressant de connaître le rôle de l'agent d'Eaton ou *Mycoplasma pneumoniae* dans le groupe des P.A.P. en France.

C'est dans ce but et par la mise en œuvre de la technique de Liu que, dès 1962, la présente étude a été entreprise, dans le double cadre des investigations poursuivies systématiquement par M. le Professeur Sohier sur le diagnostic immunologique des P.A.P., et de l'utilisation de la réaction d'immunofluorescence dans divers domaines de l'immunologie appliquée [71-73].

A) Technique

Nous avons utilisé la méthode indirecte « à deux couches » d'immunofluorescence de Coons, qui permet la recherche et éventuellement la détection dans les sérums de malades de P.A.P., des anticorps fluorescents produits au cours de l'infection due au *Mycoplasma Pneumoniae*, en utilisant comme antigène des coupes histologiques de poumons d'embryons de poulets infectés par cet agent.

Le principe de la méthode réside en la mise en évidence optique d'un complexe immunologique par couplage de l'anticorps spécifique avec un anticorps humain conjugué au fluorochrome.

Nous allons donc étudier, dans ce chapitre :

- I. Les réactifs entrant en jeu dans la réaction.
- II. La mise en œuvre de la réaction.
- III. La lecture et l'interprétation des résultats positifs et négatifs.

I. — Etude des réactifs entrant en jeu dans la réaction d'I.F. indirecte

Ce sont l'antigène, les sérums et le « conjugué ».

1° L'ANTIGÈNE.

Il est représenté par des coupes histologiques de poumons d'embryons de poulets infectés par l'Agent de Eaton.

a) *La souche* : la souche de Mycoplasma Eaton, que nous avons utilisée pour nos inoculations a été la souche « Mac », isolée en 1944 par Eaton M.-D. [20] à partir de tissu pulmonaire humain et passée depuis lors sur œufs embryonnés. Cette souche nous a été obligeamment fournie par le Docteur B.-P. Marmion.

Toutefois, les derniers tests et titrages de sérums n'ont pu être menés à bien que grâce à l'obligeance du Docteur Hers. qui nous a cédé la souche « Masurel », isolée par lui aux Pays-Bas en 1961 [34], ainsi qu'une souche Mac standard.

b) *Inoculation* : nous avons pratiqué la culture sur œufs embryonnés de race Leghorn, vieux de 13 jours, ainsi que le recommandait Liu [48].

L'inoculation de l'œuf se fait par voie intraamniotique ; cette voie est indispensable (Liu) mais pose des problèmes de réalisation. Deux techniques d'inoculation s'offraient à nous. Si la technique sous vision directe, à travers la poche à air, de Taylor et Chialvo (1942), préconisée par Marmion, a l'avantage d'être plus précise, elle a l'inconvénient majeur d'être très traumatisante et a entraîné, lors des essais que nous avons effectués, la mort de plus de 90 % des embryons inoculés.

Ainsi, lui avons-nous préféré la technique « en aveugle » de Sohier et Esser [44], qui nous a servi pour toutes nos expériences, en entraînant cependant un déchet important puisque nous avons trouvé en moyenne 25 à 35 % d'œufs morts, 35 à 55 % de poumons négatifs et seulement 20 à 30 % de succès dans l'inoculation. Marmion ne signale que 5 à 10 % d'inoculations infructueuses.

Le fort pourcentage de nos insuccès peut être dû à ce que, à l'âge de 13 jours, l'embryon constitue dans l'œuf une masse

déjà volumineuse dont il est souvent difficile de discerner l'œil, repère précis du point d'inoculation. D'où l'incertitude de la réussite que nous avons vérifiée en injectant un colorant et nous avons chiffré les chances de succès à une sur deux.

Un indice de probabilité de la réussite de l'inoculation intraamniotique est fourni par l'observation d'un retrait vif de l'embryon devant l'aiguille.

Nous avons essayé de parer à l'inconvénient de l'incertitude d'inoculer dans le sac amniotique en inoculant en deux points de l'embryon, avec moitié dose en chaque point, et avons obtenu, sur 5 œufs : 2 œufs positifs, 2 morts et un négatif. Cette méthode peut ainsi réduire le nombre d'échecs mais est également traumatisante pour les embryons. Elle ne peut être qu'une méthode d'appoint.

Compte tenu des pertes, nous avons inoculé 20 à 50 œufs à chaque séance. Chaque œuf reçoit 0,2 ml de la suspension « virale » et après inoculation, les œufs sont mis à incuber à + 35°C pendant 7 jours. Ces œufs sont mirés quotidiennement et les morts éliminés.

c) *Prélèvement* : il se fait sur embryon de poulets de 20 jours vivant, *sans refroidissement préalable*, quelques heures seulement avant l'éclosion. Le prélèvement doit être effectué stérilement.

Après ouverture de la coquille, les embryons sont étouffés et examinés rapidement du point de vue morphologique. Il n'existe pas de critère exact mais un embryon hypotrophique signifie en général le succès de l'inoculation. Nous n'avons jamais retrouvé les lésions cutanées observées par Hers.

Après leur extraction, les embryons sont immédiatement incisés à la partie postérieure du thorax afin de prélever les poumons avec la partie basse de la trachée et les bronches souches. L'incision postérieure constitue une voie d'abord plus directe et facilite la dissection. Il n'y a pas non plus d'indice absolu d'infectivité des poumons à l'examen macroscopique mais nous avons pu remarquer que des poumons petits ou moyens et de couleur « rosée » étaient infectés dans 80 % des cas alors que de gros poumons rouges ne l'étaient que dans 10 à 20 % des cas.

Après prélèvement un petit fragment apexien de chaque

poumon est utilisé pour vérification de la stérilité bactériologique sur gélose ordinaire en boîtes de Pétri.

Ensuite chaque poumon est déposé par sa face costale sur une languette de papier sulfurisé stérile et introduit dans un tube à hémolyse stérile bouché hermétiquement, congelé rapidement à basse température et conservé à -50°C .

A la congélation dans le mélange Ethanol + Neige carbonique que nous utilisons au départ, nous avons préféré la congélation directement dans l'Azote liquide, méthode pratiquée par Hers [35], qui est plus rapide et permet de meilleures coupes ultérieures sans entraîner de détérioration de l'architecture broncho-alvéolaire.

d) *Utilisation* : les poumons stériles seront ensuite utilisés soit pour être débités en coupes histologiques, soit pour réinoculation.

1° Dans ce dernier cas, les poumons congelés sont broyés stérilement dans un mortier refroidi à -50°C avant utilisation ou dans un broyeur de verre, et dilués à raison de 1,5 ml de diluant par paire de poumons d'embryons de poulets, la suspension « virale » terminale étant estimée à « 10 % ».

Nous avons utilisé le « E.O. Diluent » préconisé par Marmion [29] et Hers [35] et constitué par du Bouillon Tryptose Phosphate (Difco) à pH 7,3 additionné de 1 % d'Albumine bovine (fraction V Armour) et de 0,3 % de Gélatine (Oxoïd). On inactive le mélange à $+56^{\circ}\text{C}$ pendant 60 minutes et on lui ajoute 1.000 U. de Pénicilline par ml.

La suspension à « 10 % » de poumons d'embryons infectés est ensuite soumise à une centrifugation lente (2.000 tours/minute pendant 10 minutes) et le surnageant est utilisé comme inoculum à raison de 0,2 ml par œuf. Nous avons utilisé au début de nos inoculations, la suspension « à 1/10 » soit pure, soit diluée à 1/2, 1/4, 1/5 et 1/10 pour en venir à la dilution systématique de 1/5 préconisée par Chanock et Coll. [4, 6 et 16] et qui s'avère la plus satisfaisante ; ces dilutions sont effectuées également dans l'« E.O. Diluent ».

Au cours de notre travail nous n'avons utilisé, pour constituer les inocula, que les poumons d'une paire dont le premier testé a révélé contenir l'Agent de Eaton.

Par ailleurs, les inocula ont été effectués de façon variable, soit à partir d'un seul poumon, soit à partir d'un broyat en commun de 2 à 3 poumons au maximum.

2° *Coupes* : ces coupes de poumons congelés sont effectuées au Microtome Young dans le cryostat Harris à une épaisseur de 4 à 5 μ , à une température de -20°C . La qualité des coupes est capitale ; de ce fait nous affûtons les rasoirs utilisés, après chaque séance complète de coupe, sur l'appareil Spencer. Les poumons à débiter sont fixés sur les porte-objets du microtome conservés dans le cryostat. Pour cela, chaque poumon congelé est orienté, hile vers le haut, et immédiatement placé dans une goutte de sérum physiologique tamponné à pH 7,4 que l'on vient de déposer sur le porte-objet. La fixation est instantanée.

Pour les tests d'infectivité des poumons, nous avons utilisé une méthode plus pratique qui consiste à congeler directement, dès leur prélèvement deux poumons de deux embryons différents, placés sur le même porte-objet du microtome, dans une goutte de gélatine (Oxoïd) à 15 % tamponnée à pH 7,4. Par ce procédé, tous les poumons peuvent être testés en un temps relativement court.

En effet, au lieu de débiter entièrement un poumon « en aveugle » et de tester son infectivité sur quelques coupes, nous avons préféré n'effectuer qu'une dizaine de coupes par poumon, sur plusieurs poumons à la fois, et les tester soit le jour-même, soit le lendemain, ce qui permet de ne couper, par la suite, en vue des tests diagnostiques, que les poumons largement infectés par l'Agent de Eaton.

Dès la section, les coupes sont recueillies sur lames porte-objets de verre préalablement lavées dans l'alcool puis refroidies à la température du cryostat. Les coupes de poumons prélevées sur le rasoir avec un petit pinceau ont tendance à s'incurver. Il est aisé d'obvier à cet inconvénient en déposant la coupe sur la lame de verre par sa face concave et de l'aplatir par pression douce exercée sur le pinceau.

Dès lors la lame de verre est retirée du cryostat et la coupe décongelée brutalement en appuyant quelques secondes la pulpe de l'index sur la face inférieure de la lame en regard de la coupe. Immédiatement après, la lame de verre est trempée dans un bain d'Acétone déshydratée et conservée à -20°C

pour une fixation de 10 minutes. Après avoir essayé la fixation à l'air, puis les fixations dans l'Acétone à la température de la pièce et à $+4^{\circ}\text{C}$, nous avons retenu la méthode de fixation à -20°C qui nous a donné les résultats les plus satisfaisants. Nous employons indifféremment l'Acétone R.P. Prolabo ou l'Acétone Fluka. L'une et l'autre sont déshydratées avant utilisation par contact avec du sulfate de calcium anhydre.

Après les 10 minutes de fixation, les coupes sont soumises à un séchage dans le courant d'air frais d'un ventilateur, pendant au moins une heure et ce temps est indispensable car il diminue déjà la fluorescence de fond non spécifique.

Donc, après séchage convenable, les coupes sont utilisées le jour-même ou stockées à -20°C . La conservation à -20°C en boîte étanche peut se prolonger plus d'un mois puisque nous avons vérifié personnellement qu'une conservation pendant 3 mois de coupes de poumon positif n'avait pas entraîné une diminution marquée de l'intensité de la fluorescence spécifique bronchique sur ces coupes testées avec le même sérum, mais par contre rendait la lecture plus facile car le fond avait perdu sa clarté diffuse initiale.

Chaque poumon n'est utilisé pour un « screening-test » ou un titrage de sérums qu'après avoir été testé au préalable par un sérum humain témoin, connu pour son titre élevé en anticorps fluorescents spécifiques, et que si une dilution à 1/20 de ce sérum permet la détection d'au moins deux foyers de fluorescence maxima. Pour les réinoculations, les poumons ayant une fluorescence moyenne à 2 croix sur un seul foyer sont valables et alors broyés avec d'autres plus positifs.

Chaque poumon fournit de 100 à 200 coupes selon sa grosseur. Toutes les coupes sont inutilisables mais nous avons observé que pour un « screening-test » de sérums, les coupes les plus valables sont celles effectuées dans la partie centrale du poumon car elles contiennent plus de mésobronches, lieux de multiplication majeurs pour l'antigène.

2° SÉRUMS EXAMINÉS.

Les sérums examinés ont été prélevés parmi les sérums de provenance diverse, examinés au Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Lyon en vue du diagnostic d'une virose pneumo-

trope.

Tous ont fait l'objet d'une recherche des anticorps vis-à-vis des Adéno-virus, des virus grippaux A et B, des virus du groupe de l'ornithose-psittacose et le plus souvent de la Fièvre Q, selon les techniques de fixation du complément utilisées au laboratoire [64, 67, 68 et 44].

a) *Choix.*

Notre choix s'est adressé en premier à des sérums présentant un taux élevé des HAF, supérieur à 160, et ensuite à des sérums contenant des HAF à un taux inférieur à ce chiffre mais montrant une montée significative.

Nous avons testé également 18 sérums sans HAF et négatifs en toute sérologie mais envoyés avec le diagnostic clinique et radiologique de « P.A.P. ».

Enfin pour contrôle de spécificité de la réaction, nous avons également examiné quelques sérums pour lesquels une autre étiologie avait été admise lors du diagnostic sérologique de « routine ».

Tous ces sérums sont conservés à -20°C depuis une période variable, allant de quelques mois à plusieurs années.

Nous avons étudié quant à nous, uniquement des sérums de 1962 et 1963.

Pour la plupart des malades (60 à 70 %) nous avons pu étudier un sérum « précoce » prélevé 6 à 8 jours après le début de la maladie et un sérum « tardif » prélevé 12 à 15 jours après le début de la maladie. Pour un petit nombre de malades, plusieurs sérums « tardifs » nous ont été adressés. Enfin parmi les sérums isolés que nous avons testés il s'agissait soit de sérums isolés au départ, soit de sérums « précoces », soit de sérums tardifs seuls.

b) *Dilutions.*

Après décongélation, tous les sérums sont dilués à la dilution de base de 1/10 en vue d'un premier « screening-test ». Le titre de certains sérums trouvés positifs lors de la réaction précédente est déterminé en testant des dilutions successives à partir de cette base et avec une raison de 1/2 jusqu'à 1/640 ou 1/1.280.

Nous effectuons toutes nos dilutions en sérum physiologique tamponné à pH 7,4 contenant 10 % de sérum de cobaye frais préparé au laboratoire pour la réaction du Test de Nelson*.

c) *Absorption.*

Les sérums peuvent être utilisés avec ou sans une absorption préalable selon les résultats d'un premier test. Dans le cas d'un sérum donnant de la fluorescence parasite, nous l'absorbons afin d'améliorer la sensibilité de la réaction et nous le testons une seconde fois.

L'absorption des sérums dilués à 1/10 selon la technique déjà citée, se fait pendant une nuit à + 4°C sur un mélange de poudres d'embryons de poulets normaux de 12 jours, et de poudres de foies de souris et de cobaye, extraites par l'Acétone selon la technique de Mellors. Nous utilisons 10 mg de mélange de poudres pour 1 cc de sérum dilué.

Après absorption les sérums sont centrifugés à 6.000 t/mn pendant 10 minutes, décantés et filtrés sur une seringue millipore.

20 à 30 % des sérums nécessitent une absorption qui améliore nettement la lecture ; dans les autres cas, nous avons pu vérifier qu'il n'existe pas de différence entre sérums absorbés et non absorbés.

3° CONJUGUÉS.

Nous avons utilisé soit une antiglobuline commerciale délivrée par Roboz (Roboz Surgical Instruments - U.S.A.), soit une antiglobuline préparée au laboratoire* selon une technique antérieurement décrite et étudiée en détail dans la thèse de D. Grospiron [33].

a) *Dilutions.*

Les dilutions convenables utilisées pour les différents con-

(*) Nous sommes très heureux d'exprimer toute notre gratitude au Docteur Sepetjian et à Mme David, qui nous ont fourni gracieusement le sérum de cobaye frais.

(*) Nous sommes très heureux d'adresser nos plus vifs remerciements à Mlle le Docteur Kratchko et à Mlle Richard, qui nous ont obligeamment cédé les conjugués préparés par leurs soins.

jugués ont été déterminés par titrage préalable, et s'effectuent en sérum physiologique tamponné à pH 7,4.

b) *Absorption.*

Les conjugués dilués doivent être l'objet d'une absorption préalable sans laquelle la lecture est gênée par une fluorescence non spécifique marquée soit de façon diffuse, soit sous forme de précipités de fluoresceïne sur la coupe.

Nous avons essayé différentes méthodes d'absorption que nous étudierons plus en détail dans un chapitre ultérieur.

Mais nous avons obtenu les meilleurs résultats par l'absorption sur poudre triple : mélange de poudres d'embryons de poulets normaux de 12 jours (entièrement broyés sauf tête, cou, pattes et ailes) et de poudres de foies de souris et de cobaye, toutes les poudres étant extraites par l'Acétone selon la technique de Mellors. Après un mélange soigneux du conjugué dilué et des poudres à raison de 100 mg x ml, l'absorption se fait à + 4°C toute une nuit sans agitation. Le lendemain le mélange est centrifugé à 6.000 t/mn pendant 10 minutes, décanté et filtré sur seringue millipore (Oxoïd). C'est cette technique d'absorption que nous avons adoptée définitivement.

Les conjugués dilués et absorbés peuvent être conservés à + 4°C pendant une semaine sans pour autant nuire à la bonne marche de la réaction.

II. — Description de la réaction

Il s'agit d'une application de la technique d'I.F. indirecte ou « en sandwich », l'antigène étant représenté par des coupes de poumons d'embryons de poulets infectés par l'agent de Eaton.

Les coupes conservées à — 20°C, sont laissées un moment à la température du laboratoire de façon à ce qu'elles se décongèlent et pour éviter qu'elles ne se décollent lors des différents temps.

En effet, la réaction consiste en trois temps ; deux temps de manipulation et un de lecture.

Premier temps : Contact-sérum :

Après décongélation, les lames reçoivent un numéro correspondant au protocole de la réaction, et les coupes sont entourées d'un cercle au diamant. Dans chaque réaction, nous incluons un sérum témoin négatif dilué à 1/10 et un positif de référence à différentes dilutions.

Pour chaque sérum et dans un but de certitude, nous avons utilisé en général deux coupes d'un même poumon.

Les coupes numérotées et cerclées, deux à trois gouttes de sérum sont déposées sur elles de telle façon que le sérum les recouvre entièrement.

Puis on laisse en contact pendant 50 minutes à $+ 37^{\circ}\text{C}$ en chambre humide. Après ce temps de contact les lames sont rincées dans un courant de sérum physiologique tamponné à pH 7,4, puis lavées trois fois pendant 10 minutes avec le même liquide. Puis les lames sont égouttées et essuyées sur toute leur surface sauf au niveau de la coupe.

Deuxième temps : Contact-Conjugué :

Une goutte de conjugué dilué, absorbé et filtré, est déposée sur chaque coupe. Puis on met en contact pendant 30 minutes à $+ 37^{\circ}\text{C}$ en atmosphère humide. Après ce temps, on rince à nouveau puis on lave 10 minutes dans un bac contenant du sérum physiologique tamponné à pH 7,4.

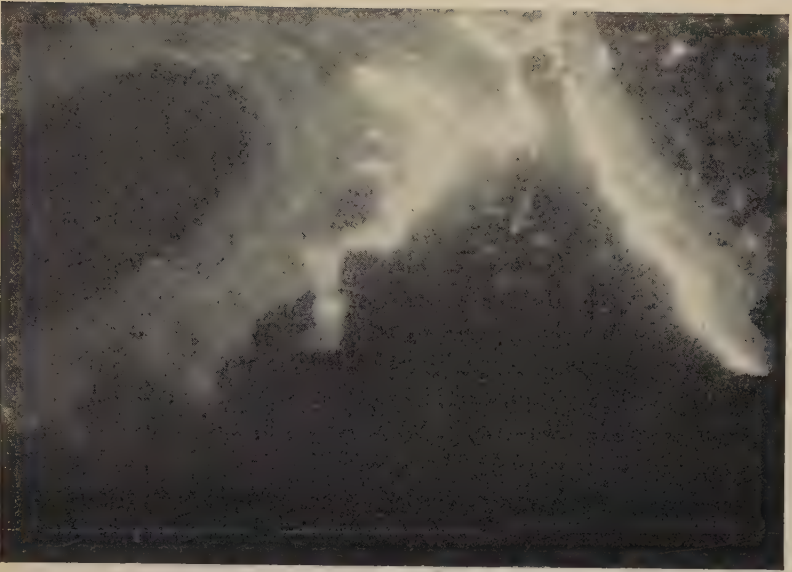
Les lames sont alors essuyées, sauf au niveau de la coupe histologique, puis montées avec des lamelles couvre-objets (lavées à l'alcool et séchées) sur lesquelles est déposée une goutte de glycérine tamponnée à pH 7. La réaction est alors terminée et prête à lire.

Troisième temps : Lecture :

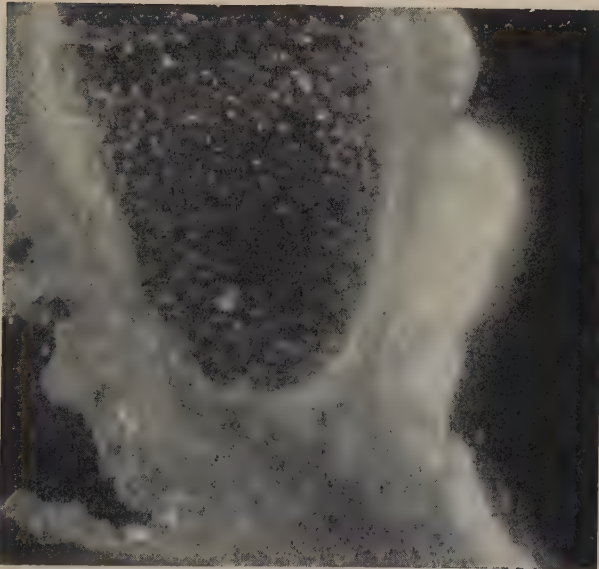
La lecture de la réaction se fait en examinant les coupes au microscope à fond noir à lumière ultra-violette fournie par un brûleur H.B.O. 200 Osram, filtrée par un filtre B 612 d'excitation et OG 1 d'arrêt. Les lames doivent être examinées au hasard en toute objectivité.

III. — Lecture de la réaction

La notation des résultats s'effectue de façon toute empi-



Photographie n° 1



Photographie n° 2

Photos 1 et 2 : Aspect correspondant à des réactions positives par la technique d'immunofluorescence indirecte sur des coupes de poumons d'embryons de poulets inoculés avec l'agent de EATiN. Bordure bronchique très fluorescente au niveau des grosses bronches dont on distingue parfaitement l'armature cartilagineuse.

rique en croix de + à ++++.

Les réactions positives se traduisent par l'existence d'une fluorescence jaune-vert intense au niveau des épithéliums des grosses bronches cartilagineuses, des mésobronches et plus accessoirement des parabronches. Nous n'avons que très rarement observé des amas de fluorescence spécifique dans la lumière bronchique, décrits par Marmion [29] et qui pourraient correspondre à des colonies de *Mycoplasma*. Les foyers positifs qui se détachent nettement sur un fond sombre ont un aspect en « nébuleuse ». Les photographies sont effectuées avec la pellicule Ektachrome lumière du jour 160 ASA (photos n^{os} 1-2). Les réactions négatives par contre se traduisent par l'absence de fluorescence au niveau des épithéliums bronchiques. Certains poumons donnent un liseré bronchique fluorescent très mince, correspondant en fait, quand on l'examine au fort grossissement, à la basale de l'épithélium et qu'il faut éviter de confondre avec une fluorescence spécifique de faible intensité.

B) Résultats

Notre étude fait état de 270 sérums correspondant à 169 malades de « P.A.P. » ou d'infections aiguës des voies respiratoires supérieures, la plupart ayant montré au cours de leur maladie l'élaboration d'H.A.F.

Les sérums étudiés provenaient de différents services hospitaliers de Lyon, Saint-Etienne, Grenoble et de quelques laboratoires de la région du Sud-Est*.

I. — Résultats obtenus avec la réaction d'I.F.

Ainsi avons-nous testé, par la méthode indirecte d'immunofluorescence sur coupes de poumons d'embryons de poulets, plus de 250 sérums de malades (dont 75 % d'enfants) de « P.A.P. », ou d'affections des voies respiratoires supérieures

(*) Nous sommes heureux d'adresser nos plus vifs remerciements à MM. les chefs de service qui ont bien voulu nous adresser les sérums, ainsi que les observations de leurs malades : MM. les Professeurs Bertoye, Brun, Félix, Monnet, Sarrouy et Seigneurin ; MM. les Docteurs Kalb, Tizzani, Tolot et plus particulièrement MM. les Docteurs Béthenod, Fleurette, Gaillard, Larbre et Riffat, qui nous ont encouragé au cours de l'élaboration de ce travail en nous réservant un excellent accueil et en nous permettant de connaître plus en détail l'histoire clinique de certains de leurs malades ayant présenté une infection par *Mycoplasma Pneumoniae* de Eaton.

avec H.A.F. dans 90 % des cas, et pendant une période de 22 mois, de janvier 1962 à fin octobre 1963.

1. TESTS QUALITATIFS.

Les résultats obtenus sont exposés dans le tableau I.

a) Dans un groupe de 139 sujets (223 sérums) présentant des H.A.F. dans leurs sérums à des taux élevés ou des montées significatives, la présence d'anticorps spécifiques de la Mycoplasmosse de Eaton a été décelée 64 fois.

Parmi ces 64 malades, deux présentaient également une grippe A avec une montée significative des anticorps fixant le complément, alors que deux montraient la présence dans leurs sérums d'anticorps fixant le complément pour les ADV* et un pour l'Ornithose, à des titres pouvant correspondre à une infection récente (Tableau II).

Par contre, chez tous les autres malades, les réactions de fixation du complément pour les virus grippaux A et B, l'ornithose et les ADV et chez certains pour la Fièvre Q, étaient entièrement négatives.

L'incidence de la maladie de Eaton apparaît ainsi de l'ordre de 46 % dans ce groupe de Pneumopathies dites « primitives atypiques » avec H.A.F.

b) Dans un deuxième groupe de 9 malades (18 sérums) présentant des symptômes radio-cliniques évoquant la P.A.P. mais n'ayant élaboré au cours et au décours de leur maladie ni H.A.F., ni anticorps fixant le complément pour les autres virus pneumotropes, deux malades seulement révélaient la présence d'anticorps fluorescents pour l'agent de Eaton à des taux supérieurs à 1/10.

Et dans ce deuxième groupe de « P.A.P. » sans H.A.F. ni autre étiologie, l'incidence de la Mycoplasmosse est donc très approximativement de 22 %.

c) Enfin dans un troisième groupe de 16 sujets dont l'affection pouvait être rattachée soit aux A.D.V. (6 cas), soit à la grippe A (5 cas), soit à la grippe B (2 cas), soit à l'ornithose (1 cas), soit à la maladie « des griffes du chat » (1 cas), soit

(*) Lire désormais pour ADV : Adénovirus.

TABLEAU I

RÉSULTATS DES RECHERCHES PAR IF SUR LE RÔLE DE L'AGENT DE EATON DANS LE DÉTERMINISME DES BRONCHO-PNEUMOPATHIES

AVEC OU SANS HÉMAGGLUTININES À FROID

BRONCHO-PNEUMOPATHIES AVEC		Nombre de Malades	Nombre de Sérums examinés	Réactions de fixation du complément positives avec les antigènes		
Réaction d'immunofluorescence pour l'agent de EATON	Réaction des Hémagglutinines à froid			Adéno-virus	Grippe : A : B :	Ornithose : Fièvre Q :
POSITIVE	POSITIVE	64	122	2	2 : 0 :	1 : 0
POSITIVE	NEGATIVE	2	4	0	0 : 0 :	0 : 0
NEGATIVE	POSITIVE	91	123	6	5 : 2 :	1 : 0
NEGATIVE	NEGATIVE	12	21	4	0 : 0 :	1 : 0
TOTAL		169	270	12	7 : 2 :	3 : 0

BRONCHO-PNEUMOPATHIES AVEC 64 sur 139 soit 46 %

Hémagglutinines à froid positives
Réaction d'immunofluorescence positive

(en excluant les 16 cas dans lesquels une autre étiologie a été admise)

BRONCHO-PNEUMOPATHIES AVEC 2 sur 9 soit 22,2 %

Hémagglutinines à froid positives
Réaction d'immunofluorescence positive

enfin à une syphilis congénitale et entraînait également une apparition d'H.A.F. dans le sérum de ces malades, la recherche des anticorps spécifiques de la maladie de Eaton est restée négative.

De même, enfin, dans l'étude de 4 cas d'A.D.V. et 1 cas d'Ornithose mais sans H.A.F., les anticorps pour l'agent de Eaton n'ont pas été retrouvés. Cette dernière étude apporte une preuve de la spécificité de la réaction, ce qui confirme les résultats de Liu [49], Chanock [4 et 6, 7] Cook [16], Marmion et Goodburn [30, 31 et 56].

2. TITRAGES QUANTITATIFS.

Bien que cette étude ait été essentiellement qualitative, nous avons titré les sérums « précoce » et « tardif » de 20 malades parmi les 62 positifs. Les résultats de ces titrages sont exposés dans les tableaux V et II.

Notre étude quantitative s'est limitée à 20 malades seulement, dont les 4 cités plus haut et présentant dans leurs sérums des anticorps pour les autres virus pneumotropes étudiés au Laboratoire.

Les titrages ont été effectués sur poumons différents et sur sérums conservés à -20°C pendant des périodes plus ou moins prolongées mais pour chaque malade, le titrage de ses sérums (2 ou plus) a été effectué dans la même séance et sur coupes successives d'un même poumon infecté. Le titre limite a été fixé à la dilution de sérum maxima donnant une fluorescence spécifique d'intensité correspondant au moins à une croix.

Nous avons pu observer des montées d'Anticorps quadruples ou supérieures, ou des taux élevés d'emblée et significatifs.

Les titres cherchés vont de 40 à 320 dans 16 cas tandis que 3 malades ont atteint 640, et un seul 1.280, titre maximum trouvé lors de ce travail.

Ainsi que l'a montré Liu [49], et que nous avons pu vérifier, les anticorps apparaissent à la fin de la première semaine de maladie et leur titre maximum est atteint entre les deuxième et troisième semaines après le début de la maladie.

Cependant 6 malades présentaient dès le 10^e jour un titre

supérieur à 160 dont un à 640 ; leur sérum « tardif » prélevé 8 à 10 jours plus tard montrait quand même un taux supérieur, d'une dilution en général.

Nous avons pu étudier l'évolution prolongée du taux des anticorps chez 3 enfants malades de P.A.P. dans le service de Pédiatrie de la Clinique de la Mutualité à Lyon, grâce à l'obligeance du Dr Gaillard. Nous avons alors trouvé que 3 mois et demi après le début de la maladie, ces enfants conservaient dans leur sérum un taux supérieur ou égal à 1/40. (Nous étudierons ces 3 cas dans un chapitre suivant). (Cf : graphiques n^{os} 1, 2 et 3.)

3. ANALYSE DES SÉRUMS POSITIFS ET POUR L'AGENT D'EATON ET POUR UN AUTRE VIRUS PNEUMOTROPE.

Les observations cliniques et sérologiques sont résumées dans le tableau n^o II.

a) Grippe A + *Mycoplasmoses de Eaton*.

Deux malades présentèrent cette association.

Les anticorps pour l'Agent de Eaton n'ont pas été titrés (sauf pour Desb.), cependant ils étaient présents dans les deux sérums testés pour chaque malade, sérums « précoce » et tardif, tandis que la montée significative de 0 à ≥ 128 d'anticorps fixant le complément pour la grippe A chez les 2 malades n'était objectivée que dans leur sérum tardif.

L'infection grippale semble donc être soit concomitante, soit plutôt secondaire à la maladie de Eaton, d'autant plus que le premier malade montre une deuxième élévation des H.A.F. que chez ce malade on a observé une baisse des anticorps pour *Mycoplasma Eaton* et qu'il aurait présenté une pneumopathie 4 à 5 mois avant.

b) A.D.V. + *Mycoplasmoses de Eaton*.

Deux malades montraient une présence d'anticorps Eaton et des taux d'A.D.V. significatifs d'infection récente sans montée d'anticorps fixant le complément.

TABLEAU II

ETUDE DES SÉRUMS RECONNAISSANT DEUX ÉTIOLOGIES =
MYCOPLASMOSE DE EATON + GRIPPE A, ADV ou ORNITHOSE

NOM-ÂGE	ORIGINE	DATES	JOUR : maladie	HAF	EATON	GRIPPE A	ADV	ORN.	DIAGNOSTIC
DES. 10 ans $\frac{1}{2}$	Crèche Ste Eugénie Dr BETHENOD	6-3-62 : 15-3-62 : 6-4-62 :	5 ^e j : 14 ^e j : 36 ^e j :	160 : 80 : 160 :	40 : ≥ 20 : 20 :	0 ≥ 128 32	- - -	- - -	Episode grippal
DEL. 64 ans	CH St Etienne Dr RIFFAT	9-3-63 : 26-3-63 :	? : ? :	160 : 80 :	+ : nt :	0 128	- -	- -	Congestion pulmo- naire
CL. 5 ans	HDB Pr MONNET	7-4-63 : 27-4-63 : 1-6-63 :	7 ^e j : 27 ^e j : 60 ^e j :	320 : 160 : 40 :	< 10 : 40 : 40 :	- - -	32 + : 32 + : 16-32 :	- - -	P A P
BOU. 10 ans	HDB Pr BERTOYE	22-5-63 : 31-6-63 :	7 ^e j : 16 ^e j :	≥ 640 : 320 :	< 10 : 320 :	- -	32 : 16 + :	- -	P A P
WIS. 12 ans	HEH S Dr LARBRE	11-6-63 : 6-7-63 :	13 ^e j : 38 ^e j :	320 : 40 :	160 : 20 :	- -	- -	32 + : 16 + :	P A P

nt = non testé

+ = résultat du test qualitatif des sérums en IF. Sérums non titrés.

Or, le deuxième de ces malades avait présenté 3 semaines avant la P.A.P. actuelle, un épisode fébrile avec angine et catarrhe des voies respiratoires supérieures ayant duré 15 jours. De plus, ce même malade présente une montée d'anticorps pour l'Agent de Eaton de 10 à 320 ; le premier élevait son taux d'anticorps pour le même agent de 10 à 40.

Dans ces 2 cas donc, l'adénovirose semble bien avoir précédé la Mycoplasmose.

c) *Ornithose + Mycoplasmose de Eaton.*

Enfin, un malade chez lequel nous avons trouvé des anticorps fluorescents spécifiques, présentait également dans ses 2 sérums « précoce » et « tardif » des anticorps fixant le complément pour le virus de l'Ornithose à des titres significatifs d'une infection récente, mais décroissants, alors qu'aux mêmes dates, les titres d'anticorps pour le *Mycoplasma Eaton* étaient respectivement 160 et 20.

Dans ce cas encore, la maladie de Eaton semble succéder à l'Ornithose, ceci étant corroboré par la clinique puisque l'enfant est atteint en juin 1963 de Bronchite aiguë segmentaire avec présence d'H.A.F., alors qu'il a présenté dans les mois précédents un épisode infectieux respiratoire prolongé.

II. — Clinique

1. *Manifestations cliniques réalisées par la Maladie de Eaton.*

Notre brève étude s'adresse à 53 malades dont nous avons pu avoir l'observation clinique, sur les 66 ayant présenté une affection pulmonaire, due à *Mycoplasma pneumoniae*, sérologiquement confirmée par le test d'Immunofluorescence.

Cette étude montre que la maladie de Eaton, en France, a les mêmes aspects cliniques que l'affection décrite sous ce nom par les auteurs anglo-saxons et hollandais (Chanock, Cook, Mufson, Kingston, Marmion et Goodburn, Hers).

Le tableau III montre le pourcentage des divers aspects cliniques réalisés par la Mycoplasmose, et trouvés dans notre étude.

TABEAU III

POURCENTAGE DES DIVERSES MANIFESTATIONS

CLINIQUES SUR 53 MYCOPLASMOSES DE EATON ETUDIEES

Manifestations cliniques	Nombre de malades	Pourcentage
P A P + H A F et signes radiologiques	40 (dont 2 HAF 0)	75,3 %
Bronchite Aigue + H A F sans signes radiologiques	5	9,5 %
Episode "grippal" + H A F	5	9,5 %
Syndrome douloureux F I D fébrile + H A F	1	1,9 %
Encéphalite aigue + H A F	1	1,9 %
Méningite aigue + H A F	1	1,9 %

Sur les 53 malades étudiés ici, et dont les sérums ont été envoyés pour recherche diagnostique de virose pneumotrope et qui montraient tous, sauf deux, la présence d'H.A.F. dans leur sérum, 40 ont présenté un syndrome clinique de Broncho-pneumopathie atypique correspondant à ce qu'il est convenu d'appeler une « P.A.P. » avec signes radiologiques évidents. Par ailleurs, 5 étaient atteints de trachéo-bronchite aiguë sans signes radiologiques (correspondant au syndrome de « Bronchitis resembling atypical pneumonia » des auteurs anglo-saxons [15]) et 5 autres accusaient un épisode qualifié communément de « grippal » avec clocher fébrile, myalgies, cépha-

lées et quelques autres symptômes d'atteinte des voies respiratoires supérieures (correspondant à l' « Acute Respiratory Disease » de la classification proposée par la Commission on Acute Respiratory Diseases) [15].

De plus, une fillette se présentait avec une fièvre inexpliquée et une douleur de la fosse iliaque droite (pour laquelle le diagnostic d'appendicite aiguë a été éliminé cliniquement) et une lymphomonocytose sanguine.

Enfin deux malades présentaient des signes d'atteinte neurologique isolée. Chez un malade de 27 ans le diagnostic d'encéphalite était porté devant un coma hyperthermique avec Hémiplegie droite s'étant installé en 2 jours et prolongé 26 jours. Les résultats de la ponction lombaire étaient en faveur d'une réaction méningée (276 éléments blancs dont 80 % de Poynucléaires) ; de plus, le sujet accusait également une sinusite frontale bilatérale et on avait soulevé le diagnostic d'abcès du cerveau d'origine sinusienne. La trépanation se révélait négative au vingtième jour.

La 2^e malade, une enfant de 3 ans 1/2, accusait, elle, un syndrome « grippal » fébrile avec cyanose, dyspnée et quelques quintes de toux coqueluchoïde depuis quelques jours ; mais surtout elle se présentait avec une raideur méningée, des céphalées et de la photophobie.

Il était intéressant de titrer les sérums de ces malades afin de pouvoir attribuer leur affection au *Mycoplasma Eaton* en objectivant une montée des anticorps. La 2^e malade montre une élévation de ses anticorps fluorescents de 10 à 80-160, tandis que le titrage des sérums du 1^{er} malade n'a pu être effectué à l'heure actuelle.

Une troisième malade classée par nous dans le groupe des « P.A.P. » vraies, dues à l'Agent de Eaton, présentait également une légère réaction méningée (obs. Gal. A. dans le Tableau V').

Ces trois cas singuliers sont à rapprocher des observations presque identiques de Chanock [4] et élargissent les connaissances sur le pouvoir pathogène de *Mycoplasma Eaton* chez l'homme.

2. La Broncho-pneumopathie de la Maladie de Eaton.

L'histoire clinique des malades de P.A.P. « Eaton » se retrouve identique chez tous les malades et ne présente pas de différence marquée avec l'aspect des pneumopathies virales en général, déjà décrites (Sohier [66 et 68] - Jeune [39].

Il n'existe pas de critère radio-clinique de la Broncho-pneumopathie due à l'agent de Eaton, et si cette maladie doit perdre le qualificatif de « Primitive », elle n'en reste pas moins atypique.

Le début de la maladie se fait le plus souvent sur le mode aigu par une fièvre élevée à 39°-40°C, des signes généraux plus ou moins accentués avec malaise, anorexie, parfois amaigrissement ; des signes de catarrhe des voies respiratoires sont souvent associés : rhinopharyngites dans 50 % des cas et otalgies dans 2 cas. La toux apparaît rapidement et existe dans 90 à 95 % des cas : toux sèche au début, parfois coqueluchoïde, puis grasse, ramenant une expectoration jaunâtre.

Les signes de début comportent également un « point de côté » thoracique dans 80 à 90 % des cas, des myalgies et arthralgies dans 8 cas et un syndrome douloureux abdominal localisé à la fosse iliaque droite dans 2 cas, sur 53 observations étudiées. Les signes d'auscultation pulmonaire, constitués pour la plupart du temps de râles, surviennent 4 à 5 jours en moyenne après le début de la maladie.

Les examens paracliniques montrent une vitesse de sédimentation accélérée dans tous les cas, et une formule sanguine variable soit normale, soit à tendance lymphocytaire, soit à tendance leucocytaire avec polynucléose.

An point de vue sérologique, les malades présentaient tous, sauf deux, des H.A.F. dans leur sérum. De plus, chez un enfant de 4 ans, la pneumopathie s'est accompagnée d'une positivité transitoire des réactions sérologiques effectuées avec les antigènes cardiolipidiques utilisés pour le diagnostic de la syphilis. L'Agent de Eaton interviendrait donc dans le déterminisme du syndrome décrit par Fanconi et Hegglin et retrouvé dans un faible pourcentage de cas de P.A.P. par Sohier [68].

Les divers aspects radiologiques rencontrés au cours de la Mycoplasmosé de Eaton, sont ceux des bronchopneumopathies virales décrits par Jeune, Sohier et Coll. [39 et 68]. L'aspect le plus habituel est celui de traînées ou de condensations hété-

rogènes floues, à limites segmentaires imprécises mais de topographie hiliobasale prédominante et est trouvé dans 50 % des cas. Une condensation dense, d'aspect pneumonique, a été retrouvée dans environ 20 % des cas, et le plus souvent elle était isolée. Un troisième aspect, retrouvé dans 20 % des cas et chez des enfants uniquement, est celui de l'atélectasie par bronchite segmentaire aiguë, le plus souvent lobaire inférieure. Il est intéressant de noter que cet aspect n'a jamais été rencontré dans les pneumopathies à A.D.V. (Jeune et Sohier) [39]. On trouve également des aspects de miliaire dans un cas et de fausses images d'adénopathies hilaires. Dans 20 % des cas, il existe des associations d'images radiologiques. Enfin, 4 malades sur 40 ont présenté une réaction pleurale plus ou moins abondante, de type sérofibrineux. Parmi ces 4, deux présentaient des taux élevés d'anticorps pour le *Mycoplasma Pneumoniae*, respectivement à 1.280 et 640. (Tableau V, obs. CHA. et RU.).

Une 5^e malade de 11 ans (PER. Chantal, Service du Docteur Béthenod, à l'Hôpital Debrousse), a présenté une pleurésie séro-fibrineuse de la grande cavité droite, isolée, dont l'origine tuberculeuse ou virale n'avait pu être mise en cause alors, malgré de nombreuses recherches. Une régression rapide (3 semaines environ), a été obtenue par corticothérapie et antibiothérapie (Streptomycine-Rimifon).

Il est intéressant de noter que cette malade n'a pas élaboré d'H.A.F. et que ses anticorps fluorescents pour l'agent d'Eaton, qui n'ont pu être titrés à l'heure actuelle, sont retrouvés dans les trois prélèvements de sérum que nous avons testés qualitativement.

Dans deux cas, des bronchoscopies ont été pratiquées et ont montré un aspect de trachéobronchite inflammatoire et, dans un cas, une sténose de la bronche souche gauche (Tableau II, obs. WIS.).

L'évolution de la maladie a été bénigne dans tous les cas, avec guérison clinique en 15 jours et nettoyage radiologique en 3 semaines en moyenne, sauf pour 6 malades chez lesquels l'affection a été prolongée plus d'un mois sous traitement. Chez 4 de ces 6 derniers malades, l'évolution et l'aspect radiologique de la maladie avaient fait évoquer le diagnostic d'Ornithose, mais la sérologie pour ce virus est restée dans tous les cas négative.

La thérapeutique la plus efficace a été celle par les Tétracyclines, mais quelques succès (10 à 12 cas) ont été paradoxalement obtenus avec la Pénicilline.

Ainsi donc, la Mycoplasmosse de Eaton, si elle produit en majorité des Bronchopneumopathies aiguës, peut être à l'origine de manifestations cliniques variées allant de la simple fièvre inexpliquée à la méningite. Et ceci devrait faire inclure le Mycoplasma de Eaton dans l'éventail déjà étendu des agents étiologiques recherchés systématiquement à l'origine des différentes affections morbides chez l'homme.

3. *Essai d'Epidémiologie.*

— Tous les cas étudiés ici ont été en majorité sporadiques.

Quelques cas de P.A.P., observés en septembre et octobre 1963 dans les différents services de Pédiatrie de Lyon et dans 70 % desquels le Mycoplasma pneumoniae a été mis en cause seul, par la réaction d'Immunofluorescence, ont pu être rapportés à une petite épidémie urbaine.

— Par contre, nous avons pu étudier une contamination familiale certaine, dans laquelle deux sœurs ont été infectées consécutivement par l'Agent de Eaton (tableau V, obs. Gal. G. + Gal. A.). La première, âgée de 14 ans et demi, a présenté une P.A.P. avec H.A.F. et a dû être hospitalisée à la Clinique de la Mutualité, où le diagnostic de bronchite segmentaire a été porté devant la clinique et l'image radiologique d'atélectasie du lobe inférieur gauche.

Quatorze jours exactement après elle, sa sœur cadette, âgée de 12 ans, a présenté la même symptomatologie mais beaucoup plus accentuée, avec fièvre à $+ 41^{\circ}\text{C}$, point de côté douloureux et légère réaction méningée. Elle a été hospitalisée à son tour et le diagnostic de bronchite segmentaire porté devant la même image d'atélectasie du lobe supérieur gauche.

Les deux sœurs ont élaboré des H.A.F. dans leurs sérums, la première à un titre de 640, et la deuxième à 320 ; nous avons pu titrer cinq sérums de la première malade et trois de la seconde. Ils ont montré, dans le premier cas, une montée d'anticorps pour l'agent de Eaton de 160 pour le sérum précoce à 640 dans la deuxième semaine après le début de la maladie. Trois mois et demi plus tard, la malade conservait

des anticorps à un titre supérieur à 1/40. Dans le deuxième cas, la montée a été moins spectaculaire, puisque au 10^e jour le titre des anticorps fluorescents était inférieur à 10. Cependant, nous pouvons imaginer que cette malade a élaboré des anticorps spécifiques dans la semaine suivante et à des chiffres significatifs, puisque 3 mois après elle conserve un taux de 40.

L'évolution des H.A.F. et des anticorps fluorescents chez ces deux malades est étudiée sur les graphiques I et II.

Cette petite épidémie ressemble point par point à celle décrite par Johnson et Coll. [41]. Elle nous permet de fixer la période d'incubation de la maladie entre 10 et 15 jours et la phase d'invasion entre 2 et 3 jours, et nous montre son caractère très contagieux. Elle vérifie enfin le retard de l'apparition des anticorps spécifiques par rapport à celle des H.A.F., retard de 8 jours en moyenne.

— Nous avons étudié également le pourcentage de malades ayant présenté une maladie de Eaton parmi le nombre total de sérums de malades de P.A.P. avec H.A.F., testés, par rapport à leur origine hospitalière. Les résultats sont exposés dans le tableau IV.

Les pourcentages vont de 20 à 50 % dans les divers services de Lyon, Grenoble et Saint-Etienne, sauf à la Clinique Mutualiste où, sur 16 enfants malades testés, 81 % se sont révélés atteints de la Mycoplasmosse de Eaton.

— Au cours de cette étude, nous avons vérifié que la maladie peut se produire à tous les âges, de 16 mois à 83 ans, avec cependant une prédominance pour les enfants de 2 à 10 ans d'une part, et les sujets de 10 à 20 ans d'autre part, qui représentent respectivement 37 et 31 % des malades infectés par l'Agent de Eaton.

— Enfin, et comme l'a montré Cook [16], il n'y a pas d'effet de la saison sur l'infection puisque dans notre étude, portant sur 22 mois, la Mycoplasmosse de Eaton a été retrouvée à tous les mois de l'année en général avec prédominance pour les mois de juin (10 positifs), octobre (8 positifs), avril (7 positifs) et août (7 positifs).

Au terme de cette brève étude épidémiologique, il est vérifié que l'affection due au *Mycoplasma pneumoniae* a une

POURCENTAGES DE REACTIONS D'I.F. POSITIVES POUR L'AGENT D'EATON

TABLEAU IV

parmi les MALADES de PAP AVEC ou SANS HAF mais SANS AUTRE

ETIOLOGIE, par rapport à leur ORIGINE HOSPITALIERE

P R O V E N A N C E S		Total de Malades Testés	Nombre de malades EATON +	Pourcentage de positifs
Hôpital Edouard Herriot Pav. S	Pr BERNHEIM	15	7	46,6 %
Hôpital Debrousse	Pr MONNET	7	3	42,8 %
Hôpital Debrousse	Pr BERTOYE	9	4	44,5 %
Hôpital Debrousse	Dr BETHENOD	4 + 7 (HAF -) = 11	1 (HAF -) + 1 = 2	18,1 %
Clinique de la Mutualité	Dr GAILLIARD	15 + 1 (HAF -) = 16	13	81,2 %
C H R Grenoble	Pr SEIGNEURIN	22	11	50 %
Clinique Médicale Infantile de Grenoble	Dr TIZZANI	29	8	27,6 %
C H Saint-Etienne	Dr RIFFAT	8	3	37,5 %
Hopital Jules Courmont	Dr TOLOT	9	4	44,5 %
Hopital Sainte Eugénie	Pr BRUN	3	2	66,6 %
Sainte Eugénie Crèche	Pr SARROUY	10	2	20 %
AUTRES ORIGINES		Assy 1/1 * Voiron 1/1	H. C. Besançon 1/1 H M I D Lyon Service Pr FELIX 1/1 (HAF-)	H. C. Cannes 1/2

* Nombre de Malades positifs / Nombre de malades testés (1/1 ou 1/2) /
 ** (HAF -) = Malades n'ayant pas élaboré des Hémagglutinines à froid lors de leur pneumopathie.

période d'incubation de 10 à 15 jours, qu'elle est contagieuse, et peu influencée ni par l'âge des sujets, ni par la saison.

Enfin, cette infection semble peu épidémique et intervient surtout sous forme de cas sporadiques dans toute la région du Sud-Est de la France.

III. — Evolution comparée des HAF et des Anticorps fluorescents spécifiques pour l'Agent de Eaton

Il était intéressant d'effectuer cette étude, puisque la présence d'H.A.F. dans les sérums de malades de broncho-pneumopathies « virales » à virus non identifié, est, depuis les études de Turner [75], Peterson [58] et Eaton et Coll. [20-23], un indice de probabilité d'infection par le *Mycoplasma* de Eaton. Nous avons nous-même utilisé ce critère dans le choix des sérums des malades que nous avons testés par la méthode d'immunofluorescence. D'ailleurs, tous les malades étudiés, sauf 9, possédaient des H.A.F. dans leur sérum et, sur 66 malades trouvés infectés par l'Agent de Eaton, 64 présentaient dans leur sérum des H.A.F. à des taux nettement significatifs.

Notre étude comparative portera sur les 20 malades atteints de Mycoplasmoses et que nous avons titrés. Les H.A.F. ont été recherchés au Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Lyon, selon la méthode décrite par Sohier*.

Les résultats de cette étude sont résumés dans les tableaux V et V'. De plus, l'étude de l'évolution comparée dans le temps, des H.A.F. et des anticorps spécifiques dans trois cas particuliers pour lesquels nous avons eu plusieurs prélèvements, est exposée sur les graphiques n° 1, 2 et 3. Le lecteur voudra bien se reporter également au tableau II, où 4 cas d'évolution de divers anticorps associés à ceux pour le *Mycoplasma* Eaton sont étudiés.

De l'examen de ces tableaux, objectivé en particulier pour 3 cas par les graphiques, il ressort qu'il n'existe pas de correspondance nette entre la date d'apparition des H.A.F. et

(*) Nous adressons nos remerciements les plus sincères à Mme Gramusset, qui nous a initiés à la technique de recherche des HAF et a bien voulu nous confier tous les résultats des tests sérologiques effectués par elle au laboratoire.

TAUX

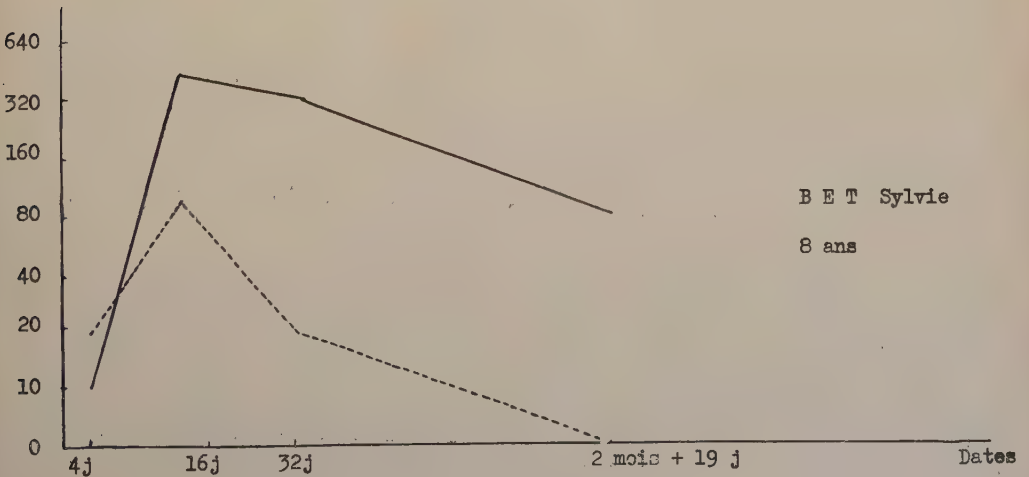
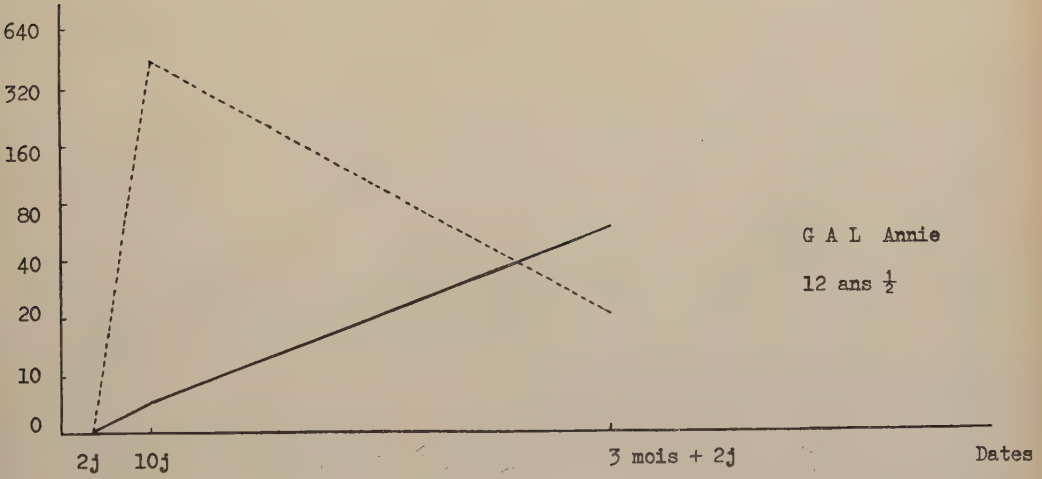
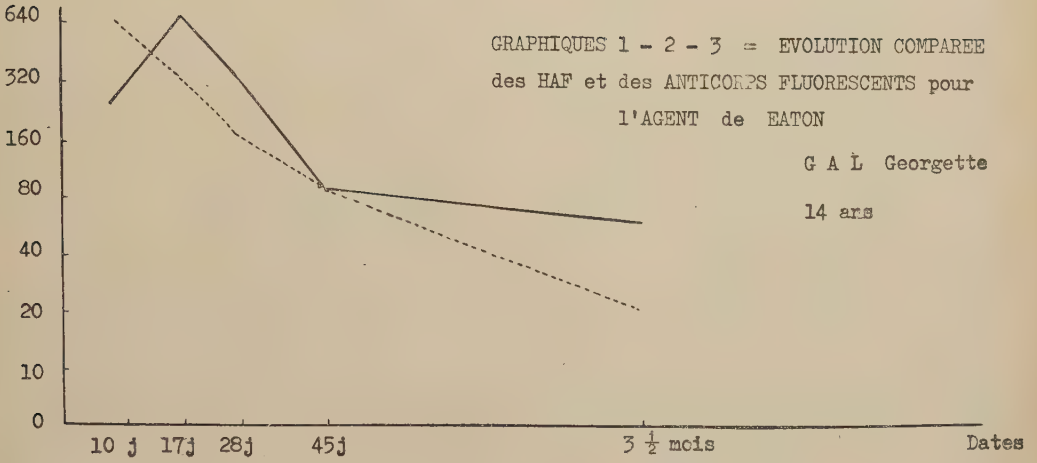
--- HAF

— EATON

GRAPHIQUES 1 - 2 - 3 = EVOLUTION COMPAREE
des HAF et des ANTICORPS FLUORESCENTS pour
l'AGENT de EATON

G A L Georgette

14 ans



EVOLUTION COMPAREE des ANTICORPS FLUORESCENTS

pour l'AGENT de EATON et des HAF chez 16 malades

TABIEAU V

Noms Prénoms	Age	Origines	Dates de Prélèvements	Jours de Maladie	EATON	H2A.F	Autres Sérologies	DIAGNOSTIC
GOR. Jacques	10 ans	Pr BRUN	10-5-62 21-5-62	? ?	40 160/320	640 80	Grippe A16 8	P. A. P.
POU. Eric	12 ans	Dr TIZZANI	4-10-62 15-10-62	7è j 18è j	160 320	640 0	0 0	PAP = Atelectasie avec réaction pleurale minime
MOU. Simone	?	Laborde VOIRON	10-10-62 20-10-62	10è j 20è j	40 160	160 0	0 0	P. A. P.
MEN. Gilbert	11 ans	Pr MONNET	17-10-62 31-10-62 14-11-62	8è j 22è j 36è j	320 160 ≥ 40	160 0 0	0 0 0	Pneumopathie aigue : infiltrat du sommet gauche
LAC. M. Christine	9 ans *	Dr GAILLARD	16-10-62 24-10-62	3è 4è j ? 11 12è j ?	0 ≥ 40	160 40	0 0	Syndrome douloureux fébrile de la FID sans appendicite
VIL. Sophie	8 ans	Labo d'ASSY	1-12-62 21-12-62	6è j 26è j	0 ≥ 40	0 160	0 0	Pneumopathie aigue virale
CHA.		Dr TIZZANI	1-2-63 11-2-63	8 10è j 15 17è j	20/40 160	160 160	0 0	P. A. P.
RU. Yves	8 ans	Pr BERNHEIM	2-2-63 11-2-63	9 15è j 18 24è j	≥ 320 ≥ 640	640 320	0 0	Pneumopathie de la base droite avec réaction pleurale minime

TABLEAU V - Suite

Noms Prénoms	Age	Origines	Dates de Prélevements	Jours de Maladie	EATON	H.A.F	Sérologies:	Autres	DIAGNOSTIC
DAL. Sylvain	5ans $\frac{1}{2}$	Pr BERNHEIM	2-2-63 11-2-63	8è j 17è j	320 320/640	640 80		0 0	:Pneumopathie aigue :gauche : infiltrat :lingulaire
TOM. Chelbia	11 ans	Pr BERTOYE	6-6-63 15-6-63	9è j 18è j	160 320	160 160		0 0	:Bronchoalvolute bila- :térale
GAL. Georgette	14 ans	Dr GAILLARD	6-6-63 13-6-63 24-6-63 11-7-63 12-9-63	10è j 17è j 29è j 45è j 3 mois $\frac{1}{2}$	160 640 320 80 ≥ 40	640 320 160 80 20		0 0 0 0 0	:Bronchite segmentaire :Atelactasie du lobe :inférieur gauche
GAL. Annie	12ans $\frac{1}{2}$	Dr GAILLARD	12-6-63 20-6-63 12-9-63	3è j 11è j 3 mois + 3 j	0 < 10 ≥ 40	≥ 320 2C		0 0 0	:Bronchite segmentaire :Atelactasie du lobe :inférieur gauche
MEND. Justo	4ans $\frac{1}{2}$	Dr GAILLARD	6-6-63 13-6-63	? ?	160 320	160 40		0 0	:PAP (bronchite semen- :taire droite)+oreillons
ROC. Claude	4 ans	Dr GAILLARD	29-6-63 9-7-63	11è j 21è j	40 320	≥ 640 320		B W + transitoi- rement	Syndrome de WANOONI - HEGGLIN (atélectasie :L. I. D.)
BET. Sylvie	8 ans	Dr GAILLARD	4-7-63 16-7-63 2-8-63 19-9-63	4è j 16è j 32è j 3 mois + 9 j	10 ≥ 320 320 ≥ 40	20 80 20 0		0 0 0 0	:Bronchite segmentaire :PAP Atelactasie du :lobe inférieur droit :(Association d'images :radiologiques)
CHA. J. Louis	13 ans	Dr TIZZANI	29-8-63 9-9-63	10è j 20è j	640 1280	640 320		0 0	:PAP + arthralgies fu- :gaces (Réaction pleu- :rale base gauche)

celle des anticorps spécifiques pour le mycoplasma de Eaton.

Dans la plupart des cas cependant, les anticorps spécifiques apparaissent avec un retard de 8 à 10 jours en moyenne sur les H.A.F. Le taux maximum des anticorps spécifiques est réalisé alors au moment de la chute ou de la disparition des H.A.F. Ainsi que l'ont montré Liu [49], Chanock [6-7], Kingston [42] et d'autres auteurs [16, 28, 34 et 51], les deux réponses sérologiques, l'une spécifique, l'autre non spécifique, sont donc en général décalées dans le temps.

La présence des H.A.F. est-elle un critère d'infection par l'Agent de Eaton ? Dans notre étude complète, un malade sur deux atteints de P.A.P. avec H.A.F. est infecté par *Mycoplasma pneumoniae*, alors que les auteurs anglo-saxons trouvent des chiffres bien supérieurs.

Cependant, sur 20 derniers malades présentant des H.A.F. atteignant dans tous les cas des taux ≥ 320 , avec des montées quadruples ou supérieures, nous avons trouvé 70 % de sujets atteints par le *Mycoplasma*, ce qui laisse à penser qu'un taux élevé d'H.A.F. est un meilleur critère de maladie de Eaton.

Par ailleurs, à des taux élevés d'H.A.F. correspondent en général des taux également élevés d'anticorps fluorescents spécifiques, sauf dans un cas (graphique n° 3). Par contre, 4 cas (dont l'observation schématisée sur le graphique 2) présentant des H.A.F. à des taux supérieurs à 160 n'ont élaboré des anticorps spécifiques qu'à des taux faibles (1/40) tout en objectivant cependant une montée de 0 à 40 de ces anticorps, donc quadruple et significative.

Dans ces cas-là, on pourra peut-être regretter que les sérums tardifs aient été prélevés à des dates peu propices par rapport au début de la maladie, soit trop tôt, soit trop tard, comme le sont par exemple les deux sérums tardifs de l'observation du graphique n° 2.

IV. — Problème particulier des HAF au cours des infections à ADV

L'étude d'une épidémie d'infections à A.D.V. (65, 67 et 69), ainsi qu'une enquête générale sur les bronchopneumopathies à virus et à rickettsies chez l'enfant, effectuée en 1957 [Sohier (66) (68)], a montré la coexistence, dans un faible pour-

centage de cas, d'anticorps fixant le complément en présence de l'antigène des A.D.V. et d'Hémagglutinines à froid, à des titres significatifs ou avec une augmentation des anticorps valable dans les deux cas.

Or, il est admis [Hilleman (36), Dascomb (18), Huebner et Rowe (38)] que l'infection de l'arbre respiratoire par les Adénovirus ne provoque pas l'apparition d'hémagglutinines à froid.

Préoccupés de savoir si l'infection à A.D.V. s'accompagne réellement de la présence d'H.A.F. dans le sérum des malades, nous avons cherché à éliminer le rôle de l'Agent de Eaton dans le déterminisme de cette constatation de l'association des H.A.F. et des anticorps fixant le complément pour les adénovirus.

Par la méthode d'I.F., nous avons testé 21 sérums correspondant à 12 malades (les résultats sont exposés dans le tableau VII) pour les années 1961 et 1962. Les sérums de ces malades avaient fait l'objet de recherche d'anticorps fixant le complément et d'H.A.F. au Laboratoire d'Hygiène de la Faculté*. (Pr. Sohier.)

Tous présentaient des anticorps fixant le complément pour les A.D.V. à des titres ≥ 64 ou montraient une augmentation de ces anticorps de 0 à 16 dans deux cas. Les H.A.F. étaient retrouvées à des taux, en général de l'ordre de 40 ou 80, sans augmentation significative, sauf dans 2 cas (0 à 40) ; deux autres cas élevaient leur taux d'H.A.F. d'une dilution seulement.

Sur ces 12 malades, nous avons pu mettre en évidence dans 2 cas le rôle de l'Agent de Eaton. Dans le premier cas (obs. Lab.), les H.A.F. sont stables à 80 lors des deux prélèvements, et l'on peut admettre que leur présence est due à l'agent de Eaton, mais il est impossible de préciser la chronologie relative des deux infections : l'Adénovirose et la Mycoplasmosé.

Il en est de même dans le deuxième cas (obs. Com.), qui présente des taux faibles d'A.D.V. mais avec une montée de 0 à 16 et des H.A.F. stables à 40. Il serait intéressant de titrer

(*) La liste de ces sérums nous a été aimablement communiquée par Mme Cramusset, que nous sommes heureux de remercier ici.

dans ces sérums les anticorps fluorescents.

Dans aucun cas nous n'observons la montée concomitante des anticorps pour les A.D.V. et les H.A.F., car le cas de l'obs. Pou. n'est pas entièrement valable du moment que les H.A.F. n'augmentent que d'une dilution.

Nous ne pouvons donc tirer de ces documents une conclusion formelle mais si, dans 2 cas sur 12, l'élévation des H.A.F. au cours de ces adénoviroses peut être expliquée par une injection due au *Mycoplasma* de Eaton, dans la majorité des cas (10 sur 12) une telle explication n'est pas valable.

TABLEAU VII

RESULTATS des RECHERCHES d'ANTICORPS pour l'AGENT de EATON
dans le CAS d'INFECTIONS
par ADV ACCOMPAGNEES de la PRESENCE d'HAF

* + Réactions positives en IF

** - Réactions négatives en IF

Sérums non titrés

Noms - Prénoms	Date de Prélèvements	A D V	H A F	EATON
LAB. J.-François	2-9-61	≥ 128	80	+ *
	12-9-61	128	80	+
DEM. Thierry	4-10-61	64	40	- **
	14-11-61	32	80	-
PET. Dominique	13-11-61	128	80	-
	21-11-61	64	20	-
NEC. Pierre	30-11-61	128	0	-
	8-12-61	128	40	-
PAN. Christian	15-2-61	0	40	non testé
	24-2-61	64	0	-
LIA. Claudine	30-1-62	64 ⁺	80	-
GAT. Claude	21-2-62	64 ⁺	40	-
	27-2-62	32 ⁺	0	-
DAL. Patrick	13-3-62	0	40	-
	26-3-62	128 ⁺	20	-
POU. Pierrette	16-3-62	0	80	non testé
	26-3-62	16	160	-
DEP. Alain	6-4-62	128	0	-
	18-4-62	16	40	-
REN. J.-Luc	20-11-62	0	40	-
	4-12-62	128	40	-
	19-12-62	64	80	-
COM. Gilbert	10-12-62	0	40	non testé
	20-12-62	16	40	+

DISCUSSION

A) *Technique* : appréciation de quelques facteurs intervenant dans la réaction.

La technique d'I.F., qui comporte différents temps dans sa mise en œuvre, est d'une réalisation longue et nécessite une mise au point minutieuse de tous les réactifs et nous allons étudier, dans ce chapitre, différents facteurs intervenant pour une grande part dans la réussite de la réaction.

1. *Facteurs propres à la technique d'I.F.*

a) *Les conjugués* :

Ce sont des conjugués fluorescents que dépendent en grande partie la qualité et la réussite de la technique, puisque grâce à eux le complexe immunologique est mis en évidence.

Or, la technique d'immunofluorescence appliquée au diagnostic de l'infection par l'agent de Eaton, nécessitant l'utilisation comme antigène de coupes histologiques de poumons d'embryons de poulets infectés, il n'est pas possible d'obtenir une lecture aisée et, de ce fait, une réaction sensible, par l'emploi, dans le deuxième temps du test, de conjugués non absorbés.

Dans ce cas, en effet, les tissus pulmonaires donnent, en présence du fluorochrome, une fluorescence de fond, parasite importante de laquelle la fluorescence spécifique bronchique est difficile à distinguer.

C'est dans le but de diminuer la fluorescence non spécifique que Liu [49], Chanock [4 et 6] et Marmion [29 et 52] entre autres, utilisent depuis les débuts de leurs travaux des conjugués absorbés au préalable.

Nous en avons nous-mêmes fait l'expérience et, après avoir utilisé des conjugués non absorbés qui nous donnaient

des résultats ininterprétables, nous avons essayé différentes méthodes d'absorption.

Tout d'abord, nous avons utilisé l'absorption des conjugués sur poudre de foie de souris extraite par l'acétone. Le mélange était agité deux fois une heure sur agitateur mécanique, centrifugé une première fois à 5.000 t/mn pendant 10 minutes, et le surnageant ainsi obtenu centrifugé une deuxième fois sur centrifugeuse Servall à 12.000 t/mn. Cette technique nous a donné des résultats variables et, le plus souvent, pas satisfaisants.

Une amélioration légère a été obtenue avec l'absorption des conjugués sur cellules de rein de singe R.L. 9 (cellules de 15 jours), mais le résultat n'était pas encore idéal.

Nous avons obtenu les meilleurs résultats par absorption sur poudre triple, qui est un mélange soigneux à parts égales de poudre d'embryons de poulets normaux âgés de 12 jours (entièrement broyés, sauf la tête, le cou, les pattes et les ailes) et de poudres de foies de souris et de cobaye.

Toutes ces poudres sont extraites par l'Acétone, selon la technique de Mellors.

Le mélange ainsi réalisé est agité quelques secondes et laissé en contact pendant toute une nuit à + 4°C. Le lendemain il est centrifugé à 6.000 tours/mn pendant 10 minutes, et le surnageant filtré sur seringue spéciale montée avec des filtres millipores, ou mieux, avec des disques filtrants (Oxoïd).

Ce filtrage sur seringue millipore est nécessaire car il élimine en grande partie les précipités de fluorescéine en suspension.

C'est cette technique d'absorption que nous avons adoptée définitivement et avec laquelle nous obtenons des fonds qui, s'ils ne sont pas noirs, sont du moins sombres, et la lecture est plus sensible car la fluorescence spécifique vert-jaune se détache nettement sur l'ensemble de la coupe. Un indice d'absorption convenable est donné par l'absence de fluorescence des cartilages péribronchiques ; à la lecture au fort grossissement, le contraste est évident entre ces cartilages et l'épithélium bronchique fluorescent (voir photographie n° 2).

Il faut signaler qu'avec la même technique d'absorption du conjugué et en utilisant des sérums également absorbés,

la fluorescence de fond peut varier avec des poumons différents, et pour un même poumon, les coupes superficielles ont un fond plus clair que les coupes profondes. Enfin, certains poumons montrent un liséré bronchique fin, correspondant à la basale de l'épithélium et dont la fluorescence habituelle ne disparaît pas ou disparaît très peu après absorption. Il est facile de ne pas confondre ce liséré avec une zone de fluorescence spécifique, qui serait alors de faible intensité par l'examen au fort grossissement.

Enfin, dernièrement, des essais d'absorption du conjugué sur Sephadex G 25 Medium ou Charcoal activé, suivie de filtrage, ont été effectués. Le Sephadex ne diminue pas la fluorescence non spécifique, tandis que le Charcoal activé, tout en donnant un fond plus sombre que celui obtenu avec l'absorption sur poudre triple, fait perdre, par rapport à cette dernière, un degré (une croix) d'intensité de la fluorescence spécifique.

Nous avons donc conservé pour notre technique l'absorption du conjugué sur poudre triple, suivie de filtrage.

b) *L'optique :*

Le système optique de lecture au microscope joue aussi un rôle dans la sensibilité de la réaction. Ainsi, en fin d'utilisation, une lampe usagée fait perdre une croix dans la lecture, de même que si on remplace le miroir convexe par le miroir plan, dans le système du condenseur.

2. *Facteurs propres à l'Antigène utilisé.*

L'antigène utilisé dans cette technique est représenté par des coupes histologiques de poumons d'embryons de poulets inoculés par voie intraamniotique sur œufs de 13 jours.

a) *Les œufs :*

En tenant compte des déchets dus aux morts des embryons, aux souillures bactériologiques des poumons (très rares, il est vrai) et à la non certitude d'inoculation réelle dans le sac amniotique (comme nous l'avons montré dans le paragraphe A - 1° du chapitre III), il est nécessaire d'inoculer un nombre important d'œufs.

Lors de chaque séance, nous avons inoculé par la méthode « en aveugle » de Sohier et Esser [44] de 20 à 50 œufs et nous n'avons obtenu chaque fois que 20 à 30 % de poumons infectés.

Les déchets étaient représentés par 25 à 35 % de morts répartis également sur les 7 jours du temps d'incubation et par 35 à 55 % de poumons qui se révélaient non infectés par le *Mycoplasma* lors d'un test avec un sérum de référence dilué à 1/20 ou 1/10.

Ces résultats sont en accord avec ceux décrits par Cook [16] et Evans et Brobst [28], mais en contradiction avec ceux de Liu qui trouvait 90 % des poumons infectés, et de Marmion qui fait état de 80 % de succès dans l'inoculation qu'il pratique par la méthode sous vision directe.

Par ailleurs, parmi les poumons infectés, il nous a fallu encore déduire quelque 20 % qui, lors des titrages préalables, ne se sont pas révélés utilisables pour des « screening-tests » de sérums, du fait de leur faible pouvoir antigénique.

b) *Conservation de la souche :*

Enfin, nous avons été amenés à reconsidérer le problème de conservation de la souche, laquelle, et ainsi que l'avait précisé Eaton en 1945 [21], voit son pouvoir pathogène pour l'œuf diminuer par une conservation prolongée à — 70°C dans des tubes non scellés. La souche Mac, que nous avait obligeamment fournie le Dr Marmion, de Leeds (G.B.), a perdu son pouvoir infectant pour l'embryon de poulet du fait d'une conservation d'une durée supérieure à 2 mois dans des tubes obturés par des bouchons de caoutchouc. Il est donc nécessaire de conserver la souche à — 50°C, soit sous forme de poumon entier, soit sous forme de broyat de mélanges de poumons dans l'E.O. Diluant, mais dans des ampoules ou des tubes *scellés*. Par ailleurs, il est préférable d'effectuer des passages fréquents sur œufs, afin de constituer un stock d'antigène et de perpétuer la souche.

c) *Qualité des coupes :*

L'antigène étant représenté par des coupes histologiques de poumons d'embryons de poulets, une excellente qualité des coupes est primordiale et indispensable dans la réalisa-

tion d'une réaction qui se doit d'être sensible.

Dans ce but, trois sortes d'exigences s'imposent : une bonne congélation, une bonne section et une bonne fixation.

1° Nous effectuons une *congélation* brutale des blocs de poumons en plongeant directement les tubes qui les renferment dans un bain d'Azote Liquide, selon la technique de Hers [35]. Par cette méthode, les sections se sont avérées plus aisées et les coupes de meilleure qualité qu'en utilisant la congélation à -70°C dans un mélange de neige carbonique + éthanol, préconisée par les auteurs anglo-saxons.

2° Le succès d'une *section* est obtenu sur des rasoirs souvent affûtés, et nous utilisons dans ce but l'appareil Spencer, qui a amélioré la qualité des coupes en donnant aux rasoirs un biseau très fin et très régulier. D'autre part, les coupes doivent s'effectuer à une température indispensable de -20°C maintenue fixe grâce au cryostat.

Enfin, la chambre de manipulation du cryostat doit être maintenue dans une atmosphère sèche, car nous avons observé qu'un certain degré d'humidité rendait les sections plus difficiles et provoquait un tassement des coupes.

Nous utilisons dans ce but du Silicagel bleu, qu'il est bon de changer avant les séances de coupe surtout lorsque celles-ci sont espacées de plus de trois ou quatre jours.

3° Enfin, une meilleure *fixation* des coupes, améliorant également la qualité de la réaction, a été obtenue en plongeant les lames de verre porte-objets pendant 10 minutes dans un bain d'Acétone maintenue à -20°C dans le cryostat et déshydratée au préalable par contact avec du sulfate de Calcium Anhydre.

B) Résultats

1° *Fréquence relative de l'infection par l'Agent de Eaton dans le groupe des P.A.P. avec H.A.F.*

Nous avons utilisé la méthode d'immunofluorescence mise au point par Liu en 1957 [49], qui est une application

Pour être fixés sur la sensibilité de notre réaction, nous avons fait tester un lot de sérums négatifs par le Dr R.-M. Chanock à Béthesda, mais nous n'avons pas reçu à l'heure actuelle les résultats de ce contre-test.

b) La reproductibilité de la méthode que nous avons utilisée pouvait être également mise en doute. Or, nous avons vérifié que des sérums que nous employons comme témoins positifs de référence restaient positifs au même titre lors de chaque test, et cela avec des poumons différents issus de la même inoculation ou des inoculations ultérieures.

Cependant, nous avons pu remarquer que des sérums testés peu de temps après leur prélèvement donnaient alors une fluorescence bronchique spécifique plus intense que lorsqu'ils étaient repris et testés à nouveau après un temps de conservation à — 20°C dépassant 6 mois.

Ceci a été observé avec des sérums répartis en petite quantité et conservés purs comme sérums de référence à — 20°C.

Ainsi, un de ces sérums titrant 640 en I.F. quand il a été testé en mars, a-t-il vu son titre baisser à 160, alors qu'il était testé fin octobre sur un autre poumon, lequel a permis de titrer de nouveaux sérums à 640 et même à 1.280. Ce dernier fait permettrait d'éliminer le rôle du degré de positivité des poumons infectés, dans cette observation de la variabilité du titre des anticorps dans un sérum donné, observation qui est toute personnelle. Mais on peut penser que ce phénomène est dû à un facteur sérique présent dans le sérum des malades de P.A.P. et qui disparaîtrait sous l'effet d'une conservation prolongée.

c) Choix des sérums : enfin et surtout, il semble que le choix des sérums testés entre pour une grande part dans les causes de notre pourcentage, inférieur à celui des auteurs anglo-saxons.

En effet, d'une part les sérums ont été prélevés, en majorité, à une date trop rapprochée par rapport au début de la maladie. Nous avons vérifié que les anticorps fluorescents spécifiques de la « P.A.P. Eaton » n'apparaissent que 8 à 10 jours après le début de la maladie et n'atteignent leur taux maximum que 2 à 3 semaines après ce début. Or, les sérums

« tardifs » que nous avons testés étaient prélevés en moyenne vers le 15^e jour de la maladie. Il serait souhaitable que, en vue du sérodiagnostic de la maladie de Eaton, par la méthode d'I.F., les sérums soient prélevés, l'un, ou sérum « précoce », dans les 8 premiers jours de la maladie le plus près possible du début, et l'autre, ou sérum de convalescent ou « tardif », environ 15 jours après le premier.

D'autre part, si notre choix s'est adressé à des sérums présentant des H.A.F., il apparaît qu'il n'a pas été assez strict car nous avons testé environ un cinquième de sérums (sur le nombre total) soit isolés au départ et pour la plupart sérums « précoces », soit par paires, mais n'ayant élaboré des H.A.F. qu'à un taux faible de 40. Ce choix des sérums apparaît très important puisque, lors de nos dernières expériences, sur 20 paires de sérums ayant montré la présence d'H.A.F. à un titre supérieur ou égal à 320, l'incidence de la maladie de Eaton a été retrouvée dans 70% des cas mais décelée, dans plus de la moitié des cas, uniquement dans le sérum de convalescent.

En outre, et comme il l'était signalé dans une publication précédente [73], il est possible que certaines pneumopathies grippales récentes, avec H.A.F., au cours de cet hiver 1962-1963, n'aient pas suscité l'apparition d'anticorps déviant le complément en présence de l'antigène soluble A, qui est utilisé au Laboratoire..

d) Enfin et surtout, il est possible que les pourcentages élevés rapportés par ailleurs, aient été constatés au cours d'épidémies survenant dans les collectivités dont un grand nombre de sujets étaient atteints. Or, cela est le cas pour les résultats de Kingston [42] obtenus dans des camps d'entraînement de la Marine aux Etats-Unis, et surtout de Clyde [12 et 14], qui a testé les sérums de volontaires infectés, par des produits pathologiques de malades de P.A.P., au cours des études de transmission de la maladie effectués par la Commission on Acute Respiratory Diseases [15 et 15']. Pour notre part, nous avons étudié en grande partie des cas sporadiques, mais lorsque notre étude s'est adressée à des sérums provenant d'une petite épidémie urbaine, en septembre et octobre 1963, nos résultats positifs ont atteint 70 %.

syndromes de myalgies ou d'arthralgies diffuses et enfin les syndromes de méningoencéphalites isolées.

Enfin, la Mycoplasmosé de Eaton est une maladie contagieuse, sévissant surtout sur le mode sporadique, à tous les mois de l'année et à tous les âges, évoluant en 15 jours à 3 semaines en moyenne et dont la période d'incubation est de 12 à 15 jours (14 jours exactement dans le cas que nous avons étudié).

(*) Nous adressons nos sincères remerciements à Mme le Docteur Henry qui nous a obligeamment communiqué les derniers résultats d'une enquête sur les différentes étiologies des Bronchopneumopathies virales, entreprise sous la direction de M. le Professeur Sohier et portant sur 5.618 sérums testés de 1956 à 1962 au Laboratoire d'Hygiène de la Faculté (Pr Sohier).

Au moment où nous mettions sous presse cette thèse, nous est parvenu le résultat d'un « contre-test » effectué par l'auteur américain qui a le mieux étudié le problème de l'infection par l'Agent de Eaton, le Docteur R.-M. Chanock « Chief, Virus respiratory Unit, Laboratory of Infectious Diseases, National Institutes Of Allergy and Infectious Diseases » à Bethesda (Maryland).

Ce test de contrôle a été effectué avec la réaction de fixation du complément seule, mise au point par Chanock, et sur 32 sérums de 25 malades tous positifs en HAF (sauf un) que nous avons testés en I.F. et que nous avons trouvés négatifs dans 24 cas. Les 8 autres sérums qui nous avaient montré la présence d'anticorps fluorescents spécifiques avaient été envoyés pour contrôle de spécificité de notre réaction.

Les résultats comparés des 2 réactions montrent une concordance exacte des réponses dans 28 cas. Dans 4 cas seulement que nous avons trouvés positifs en I.F., Chanock ne décèle pas la présence d'anticorps fixant le complément pour *Mycoplasma Pneumoniae*. Néanmoins, tous nos résultats négatifs sont retrouvés négatifs par Chanock.

Ce test de contrôle semble nous permettre d'affirmer la sensibilité de la technique que nous avons pratiquée, ce qui est important, en face du pourcentage de résultats positifs dans les P.A.P. avec H.A.F. que nous avons observés (46 % contre 80 % pour Chanock).

La spécificité ne nous paraît pas mise en doute formellement par les divergences enregistrées pour 4 sérums positifs pour nous et négatifs pour Chanock, si l'on tient compte de la sensibilité moindre de la réaction de fixation du complément par rapport à l'I.F., de l'avis de Chanock lui-même.

CONCLUSIONS

- 1° Après avoir rappelé la technique d'immunofluorescence de Liu qui, bien qu'elle se soit révélée délicate et exige de longues et minutieuses manipulations, représente, parmi toutes les réactions utilisées, la méthode de référence la plus sûre et le procédé de diagnostic de l'infection par l'Agent de Eaton le moins discutable, nous présentons un travail comportant l'étude qualitative de 270 sérums provenant de 169 sujets et les résultats des titrages de 20 sérums couplés.
- 2° Cette réaction nous a donné, pour l'ensemble des cas étudiés, 46 % de résultats positifs dans le groupe des pneumopathies dites « primitives atypiques », avec Hémagglutinines à froid, alors que l'auteur américain qui a effectué les plus importantes recherches sur ce problème trouve 80 à 90 % de résultats positifs.
Il est possible que cette différence tienne aux modalités d'évolution de la pneumopathie avec hémagglutinines réagissant à froid ; en effet, lorsque l'affection paraissait évoluer sur le mode épidémique dans une collectivité déterminée, on pouvait compter 70 % de réactions positives. Les sérums qui ont donné ce dernier pourcentage avaient des titres d'hémagglutinines à froid relativement élevés (supérieurs ou égaux à 320).
- 3° L'étude clinique des cas pour lesquels nous avons effectué les réactions, fait apparaître une évolution conforme aux données classiques.
En ce qui concerne l'incubation de la maladie de Eaton, nous avons pu, dans un cas précis, la fixer à 14 jours.
- 4° La constatation d'Hémagglutinines à froid chez des sujets présentant des affections de l'appareil respiratoire avec un titre significatif d'anticorps fixant le complément pour les Adénovirus, nous a conduit à rechercher si, contrairement à ce qui a été admis jusqu'ici, les Adénovirus pouvaient provoquer l'apparition d'Hémagglutinines à froid, ou si on

syndromes de myalgies ou d'arthralgies diffuses et enfin les syndromes de méningoencéphalites isolées.

Enfin, la Mycoplasmosé de Eaton est une maladie contagieuse, sévissant surtout sur le mode sporadique, à tous les mois de l'année et à tous les âges, évoluant en 15 jours à 3 semaines en moyenne et dont la période d'incubation est de 12 à 15 jours (14 jours exactement dans le cas que nous avons étudié).

(*) Nous adressons nos sincères remerciements à Mme le Docteur Henry qui nous a obligeamment communiqué les derniers résultats d'une enquête sur les différentes étiologies des Bronchopneumopathies virales, entreprise sous la direction de M. le Professeur Sohier et portant sur 5.618 sérums testés de 1956 à 1962 au Laboratoire d'Hygiène de la Faculté (Pr Sohier).

Au moment où nous mettions sous presse cette thèse, nous est parvenu le résultat d'un « contre-test » effectué par l'auteur américain qui a le mieux étudié le problème de l'infection par l'Agent de Eaton, le Docteur R.-M. Chanock « Chief, Virus respiratory Unit, Laboratory of Infectious Diseases, National Institutes Of Allergy and Infectious Diseases » à Bethesda (Maryland).

Ce test de contrôle a été effectué avec la réaction de fixation du complément seule, mise au point par Chanock, et sur 32 sérums de 25 malades tous positifs en HAF (sauf un) que nous avons testés en I.F. et que nous avons trouvés négatifs dans 24 cas. Les 8 autres sérums qui nous avaient montré la présence d'anticorps fluorescents spécifiques avaient été envoyés pour contrôle de spécificité de notre réaction.

Les résultats comparés des 2 réactions montrent une concordance exacte des réponses dans 28 cas. Dans 4 cas seulement que nous avons trouvés positifs en I.F., Chanock ne décèle pas la présence d'anticorps fixant le complément pour *Mycoplasma Pneumoniae*. Néanmoins, tous nos résultats négatifs sont retrouvés négatifs par Chanock.

Ce test de contrôle semble nous permettre d'affirmer la sensibilité de la technique que nous avons pratiquée, ce qui est important, en face du pourcentage de résultats positifs dans les P.A.P. avec H.A.F. que nous avons observés (46 % contre 80 % pour Chanock).

La spécificité ne nous paraît pas mise en doute formellement par les divergences enregistrées pour 4 sérums positifs pour nous et négatifs pour Chanock, si l'on tient compte de la sensibilité moindre de la réaction de fixation du complément par rapport à l'I.F., de l'avis de Chanock lui-même.

assistait à l'évolution consécutive ou simultanée de deux infections, l'une due aux adénovirus, l'autre au *Mycoplasma pneumoniae*. Cette dernière hypothèse s'est vérifiée mais nous n'avons pas pu affirmer que les adénovirus à eux seuls pouvaient provoquer l'élaboration d'héماغglutinines à froid.

- 5° Il serait intéressant dans un avenir proche, de compléter cette étude par la recherche, par la méthode d'immunofluorescence, de l'agent de Eaton dans les bronchopneumopathies aiguës ne relevant d'aucune autre étiologie virale et sans distinction de la présence d'héماغglutinines à froid.
-

Vu, le Doyen :
J.-F. CIER

Le Président de la Thèse :
Professeur SOHIER

Vu et permis d'imprimer, Lyon, le 3 Décembre 1963
Le Recteur, Président du Conseil de l'Université :
P. LOUIS.

BIBLIOGRAPHIE

1. BAKER J.-A. — Virus obtained from pneumonia of cats and its possible relation to cause of atypical pneumonia in man. *Science*, 1942, 96, 475.
2. BEDSON S.-P. — Primary Atypical Pneumonia. *Brit. Med. J.*, 1950, 2, 1461.
3. BOUCHER H. et PETITJEAN R. — Perspectives sur l'étiologie de la pneumonie atypique primitive type Reimann. *Lyon Médical*, avril 1958, 17, 657.
4. CHANOCK R.-M., COOK M.-K., FOX H.-H., HUEBNER R.-J. and PARROTT R.-H. — Sérologie évidence of infection with Eaton Agent in lower respiratory illness in childhood. *New Engl. J. Med.*, 1960, 262, 648.
5. CHANOCK R.-M., FOX H.-M., JAMES W.-D., BLOOM H.-H. and MUFSON M.-A. — Growth of Laboratory and naturally occurring strains of Eaton agent in monkey kidney Tissue-culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1960, 105, 371.
6. CHANOCK R.-M., MUFSON M.-A., BLOOM H.-H., JAMES W.-D., FOX H.-H. and KINGSTON J.R. — Eaton Agent Pneumonia. I. Ecology of infection in a military recruit population. *J. Amer. Med. Assoc.*, 1961, 175, 213.
7. CHANOCK R.-M., RIFKIND D., KRAVETZ H.-M., KNIGHT V. and JOHNSON K.-M. — Respiratory disease in volunteers infected with Eaton agent ; a preliminary report. *Proc. Nat. Acad. Sciences*, 1961, 47, 887.
8. CHANOCK R.-M., HAYFLICK L. and BARILE M.-F. — Growth on artificial medium of an agent associated with Atypical Pneumonia and its identification as a PPLO. *Proc. Nat. Acad. Sciences*, 1962, 48, 41.
9. CHANOCK R.-M., MUFSON M.-A., JAMES W.-D., FOX H.-H., BLOOM H.-H. and FORSYTHE B. — Recovery of PPLO of atypical pneumonia on artificial Agar Medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1962, 110, 543.

assistait à l'évolution consécutive ou simultanée de deux infections, l'une due aux adénovirus, l'autre au *Mycoplasma pneumoniae*. Cette dernière hypothèse s'est vérifiée mais nous n'avons pas pu affirmer que les adénovirus à eux seuls pouvaient provoquer l'élaboration d'héماغglutinines à froid.

- 5° Il serait intéressant dans un avenir proche, de compléter cette étude par la recherche, par la méthode d'immunofluorescence, de l'agent de Eaton dans les bronchopneumopathies aiguës ne relevant d'aucune autre étiologie virale et sans distinction de la présence d'héماغglutinines à froid.
-

Vu, le Doyen :
J.-F. CIER

Le Président de la Thèse :
Professeur SOHIER

Vu et permis d'imprimer, Lyon, le 3 Décembre 1963
Le Recteur, Président du Conseil de l'Université :
P. LOUIS.

BIBLIOGRAPHIE

1. BAKER J.-A. — Virus obtained from pneumonia of cats and its possible relation to cause of atypical pneumonia in man. *Science*, 1942, 96, 475.
2. BEDSON S.-P. — Primary Atypical Pneumonia. *Brit. Med. J.*, 1950, 2, 1461.
3. BOUCHER H. et PETITJEAN R. — Perspectives sur l'étiologie de la pneumonie atypique primitive type Reimann. *Lyon Médical*, avril 1958, 17, 657.
4. CHANOCK R.-M., COOK M.-K., FOX H.-H., HUEBNER R.-J. and PARROTT R.-H. — Sérologie évidence of infection with Eaton Agent in lower respiratory illness in childhood. *New Engl. J. Med.*, 1960, 262, 648.
5. CHANOCK R.-M., FOX H.-M., JAMES W.-D., BLOOM H.-H. and MUFSON M.-A. — Growth of Laboratory and naturally occurring strains of Eaton agent in monkey kidney Tissue-culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1960, 105, 371.
6. CHANOCK R.-M., MUFSON M.-A., BLOOM H.-H., JAMES W.-D., FOX H.-H. and KINGSTON J.R. — Eaton Agent Pneumonia. I. Ecology of infection in a military recruit population. *J. Amer. Med. Assoc.*, 1961, 175, 213.
7. CHANOCK R.-M., RIFKIND D., KRAVETZ H.-M., KNIGHT V. and JOHNSON K.-M. — Respiratory disease in volunteers infected with Eaton agent ; a preliminary report. *Proc. Nat. Acad. Sciences*, 1961, 47, 887.
8. CHANOCK R.-M., HAYFLICK L. and BARILE M.-F. — Growth on artificial medium of an agent associated with Atypical Pneumonia and its identification as a PPLO. *Proc. Nat. Acad. Sciences*, 1962, 48, 41.
9. CHANOCK R.-M., MUFSON M.-A., JAMES W.-D., FOX H.-H., BLOOM H.-H. and FORSYTHE B. — Recovery of PPLO of atypical pneumonia on artificial Agar Medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1962, 110, 543.

10. CHANOCK R.-M., JAMES W.-D., FOX H.-H., TURNER H.-C., MUF-
SON M.-A. and HAYFLICK L. — Growth of Eaton PPLO
in broth and préparation of complement fixing antigen.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1962, 110, 884.
11. CHANOCK R.-M. and Coll. — Proposed nomenclature for aty-
pical pneumonia organism (Eaton Agent). *Science*, 1963,
140, 662.
12. CLYDE W.-A., DENNY Jr F.-W. and DINGLE J.-H. — Fluores-
cent stainable antibodies to Eaton agent in human pri-
mary atypical pneumonia ; transmission studies. *J. Lab.
Clin. Med.*, 1960, 56, 799.
13. CLYDE W.A. — Demonstration of Eaton's Agent in Tissue cul-
ture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1961, 107, 715.
14. CLYDE W.-A., DENNY F.-W. Jr and DINGLE J.-H. — Fluores-
cent stainable antibodies to the Eaton Agent in human
Primary Atypical Pneumonia - Transmission studies
j. Clin. Invest., 1961, 40, 1638.
15. Commission on Acute Respiratory Diseases. — Transmission
of P.A.P. to human volunteers. *J. Amer. Med. Assoc.*,
1945, 127, 146.
- 15 bis Commission on Acute Respiratory Diseases. — The trans-
mission of primary atypical pneumonia to volunteers.
Bull. Johns Hopk. Hosp., 1946, 79, 97-167.
16. COOK M.-K., CHANOCK R.-M., FOX H.-H., BUESCHNER E.-L.,
JOHNSON R.-T. and HUEBNER R.-J. — Studies on the role
of Eaton agent in lower respiratory tract illness. Evi-
dence for infection in adults. *Brit. Med. J.*, 1960, 1, 105.
17. COONS A.-H. and KAPLAN M.-H. — Localisations of antigen in
tissue cells. II. Improvements in a method for the detec-
tion of antigen by means of fluorescent antibody. *J.
Exp. Med.*, 1950, 91, 1.
18. DASCOMB H.-E. and HILLEMANN R. — Clinical and laboratory
studies in patients with respiratory disease caused by
adenovirus (RI. APC ARD Agents). *Amer. J. Med.*, 1950,
91, 1.
19. DYER R.-E., TOPPING M.-H. and BENGSTON I.-A. — Institutional
outbreak of pneumonitis ; isolation and identification
of causative agent. *Publ. Health Rep.*, 1940, 55, 1945.

20. EATON M.-D., MEIKLEJOHN G. and VAN HERICK W. — Studies on Etiology of Primary Atypical Pneumonia. I. Filterable Agent transmissible to cotton Rats, Hamsters and Chick Embryos. *J. Exp. Med.*, 1944, 79, 649.
21. EATON M.-D., MEIKLEJOHN G. VAN HERICK W. and COREY M. — Studies on Etiology of Primary Atypical Pneumonia. II. Properties of virus isolated and propagated in chick Embryos. *J. Exp. Med.*, 1945, 82, 317.
22. EATON M.-D., VAN HERICK W. and MEIKLEJOHN G. — Studies on Etiology of Primary atypical pneumonia. III. Specific neutralization of virus by human serums. *J. Exp. Med.*, 1945, 82, 329.
23. — Serological and epidemiological studies on primary atypical pneumonia an related acute upper respiratory disease. *Amer. J. Hyg.*, 1947, 45, 82.
24. EATON M.-D. — Action of aureomycin and chloromycetin on virus of primary atypical pneumonia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1950, 73, 24.
25. — Effect of some newer antibiotics on the Agent of P.A.P. *Antibiotics Annual*, 1954-1955, p. 1046.
26. EATON M.-D. and LIU Chien. — Studies on sensitivity to streptomycin of the atypical Pneumonia Agent. *J. of Bacteriol.*, 1957, 74, 784.
27. « EATON. Agent pneumonia ». *J. Amer. Med. Assoc. Editorials*, 1961, 178, 414.
28. EVANS A.-S. and Mary BROBST. — Bronchitis Pneumonitis and Pneumonia in University of Wisconsin Students. *New Engl. J. Med.*, 1961, 265, 401.
29. GOODBURN G.-M. and MARMION B.-P. — A study of the properties of Eaton's. Primary Atypical pneumonia organism. *J. Gen. Microbiol.*, 1962, 29, 271.
30. GOODBURN G.-M. and MARMION B.-P. — Investigations of the nature of Eaton's. Primary atypical pneumonia organism. *J. Hyg. Epidemiol., Microbiol., Immunol.*, 1962, 6, 176.
31. GOODBURN G.-M., MARMION B.-P. and KENDALL E.-J.-C. — Infec-

tion with Eaton's primary atypical pneumonia. Agent in England. *Brit. Med. J.*, 1963, 5340, 1266.

32. GORDON F.-B., QUAN A.-L., COOK M.-K., CHANOCK R.-M. and FOX H.-H. — Growth of the Eaton Agent of Primary Atypical Pneumonia in chick Entodermal Tissue Culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1960, 105, 375.
33. GROSPIRON Denise. — Etude des techniques d'immunofluorescence appliquées au diagnostic sérologique des tréponématoses. *Thèse Pharmacie Université de Lyon*, 1961, n° 481.
34. HERS J.-F. — Boorhave Cursus, 1962, Leyden.
35. HERS J.-F., KUIP L.-V.-D., MASUREL N. and MULDER J. — Diagnosis of « P.A.P. » by immunofluorescence. *Ned. Tijdschri Geneesk*, 1963, 107, 74.
36. HILLEMANN M.-R. and WERNER J.-H. — Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1954, 85, 183.
37. HORSFALL F.-L. Jr, CURNEN E.-C., MIRICK G.-S., THOMAS L. and ZIEGLER J.-E. — Virus recovered from patients with P.A.P. *Science*, 1943, 97, 289.
38. HUEBNER S.-R., ROWE W.-P., WARD T.-G., PARROTT R.-H. and BELL H.-A. — Adenoidal pharyngeal conjunctival Agents. A newly recognized group of Common viruses of the respiratory system. *New Engl. J. Med.*, 1954, 251, 1077.
39. JEUNE M., SOHIER R., BÉRAUD Ch., BÉTHENOD M. et NIVELON J.-L. — Les aspects radiologiques des bronchopneumopathies virales chez l'enfant. 18^e Congrès Ass. Pédiatres de Langue Française. Genève, 1961, 3, 170.
40. JOHNSON A., cité par DINGLE et Coll. — Primary Atypical pneumonia. Etiology unknown. *Amer. J. Hyg.*, 1944, 39, 268.
41. JOHNSON R.-T., COOK M.-K., CHANOCK R.-M. and BUESCHER E.-L. — Family outbreak of primary atypical pneumonia associated with the Eaton Agent. *New Engl. J. Med.*, 1960, 262, 817.
42. KINGSTON J.-R., CHANOCK R.-M., MUFSON M.-A., HELLMAN L.-

- P., JAMES W.-D., FOX H.-H., MANKO M.-A. and BOYERS J. — Eaton Agent Pneumonia. II. Treatment with demethylchlortetracycline. *J. Amer. Med. Assoc.*, 1961, 176, 118.
43. E. KLIENEGER-NOBEL. — Pleuropneumonia like organisms Mycoplasmatacae (P.P.L.O.). *Academic Press London*, 1962.
44. LÉPINE P. et SOHIER R. — Techniques de Laboratoire appliquées au diagnostic des maladies à virus. 2^e Edition. A paraître, 1964. Masson Editeur.
45. LIU Ch. and EATON M.-D. — Study and isolation of P.A.P. virus in chick embryos by means of fluorescein labelled antibody. *Bact. Proc.*, 1955, pp. 61-62.
46. LIU Ch., EATON M.-D. and HEYL J.-T. — Studies on primary atypical pneumonia. *Bull. New-York Acad. Med.*, 1956, 32, 170.
47. LIU Ch. and HEYL J.-T. — Serological studies of primary atypical pneumonia. *Fed. Proc.*, 1957, 16, 423.
48. LIU Chien. — Studies on primary atypical pneumonia. I. Localization, Isolation and cultivation of a virus in chick embryos. *J. Exp. Med.*, 1957, 106, 455.
49. LIU Ch., EATON M.-D. and HEYL J.-T. — Studies on Primary atypical Pneumonia. II. Observations concerning the development and immunological characteristics of antibody in patients. *J. Exp. Med.*, 1959, 109, 545.
50. LIU Chien. — Studies on primary atypical Pneumonia. III. A factor in normal serum which enhances the reaction between P.A.P. virus and convalescent serum. *J. Exp. Med.*, 1961, 113, 111.
51. MARMION B.-P., and GOODBURN G.-M. — Eaton Agent. *Brit. Med. J.*, 1960, 1, 1137.
52. MARMION B.-P. and GOODBURN G.-M. — Effect of Organic gold salt on Eaton's Primary atypical Pneumonia. *Nature*, 1961, 189, 247.
53. MUFSON M.-A., MANKO M.-A., KINGSTON I.-R. and CHANOCK R.-M. — Eaton Agent Pneumonia. Clinical features. *J. Amer.*

Med. Assoc., 1961, 178, 369.

54. MUFSON M.-A., SANDERS V., WOODS S.-C. and CHANOCK R.-M. — P.A.P. due to *Mycoplasma Pneumoniae* (Eaton Agent) Report of case with a residual pleural abnormality. *New Engl. J. Med.*, 1963, 268, 1109.
55. NOCARD et ROUX. — Le microbe de la péripleurmonie. *Ann. Inst. Pasteur*, 1898, 12, 240.
56. O.M.S. Rapport au Directeur Général. — Réunion officielle sur *Mycoplasma* et les affections Respiratoires. *Leyden*, 9 avril 1962.
57. P.A.P. and *Mycoplasma Pneumoniae*. — *New Engl. J. Med.*, 1963, 268, 1141.
58. PETERSON O.-L., HAM T.-H. and FINLAND M. — Cold agglutinins (autohémagglutinins) in primary atypical pneumoniae. *Science*, 1943, 97, 167.
59. Respiratory illness caused by mycoplasma. *Brit. Med. J.*, 1963, 5340, 1246.
60. REIMANN H.-A. — Acute infection of respiratory tract with atypical pneumonia ; disease entity probably caused by a filtrable virus. *J. Amer. Med. Assoc.*, 1938, 111, 2377.
61. ROSE H.-M. and MOLLOY E. — Observations concerning etiology of P.A.P. *Science*, 1943, 98, 112.
62. SMADEL J.-E., GREEN R.-H., PALTAUF R.-M. and GONZALES T.-A. — Lymphocytic choriomeningitis = 2 human fatalities following unusual febrile illness. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1942, 49, 683.
63. SMADEL J.-E. — Atypical pneumonia and psittacosis. *J. Clin. Inv.*, 1943, 22, 57.
64. SOHIER R., MOREL M., BUISSIÈRE J., ESSER-TRIMBERGER I. et JULLIAR D.-J. — Etudes des réactions sérologiques et sanguines utilisées pour le diagnostic des pneumopathies aiguës dites « primitives atypiques » observées en France. *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, 82, 404.
65. SOHIER R. — Infections à virus dits A.P.C. en France. (A propos de deux petits foyers récents succédant à la grippe B). *Bull. Acad. Nat. Méd.*, 1956, 140, 104.

66. SOHIER R., BERNHEIM M., CHAPTAL J. et JEUNE M. — Broncho-pneumopathies à virus chez l'enfant. *Pédiatrie*, 1956, 11, 631.
67. SOHIER R., BENSIMON P., CHARDONNET Y., CHALLUT F. et FREYDIER J. — Une épidémie d'infections à adénovirus. *J. Rev. Hygiène et Méd. Sociale*, juillet 1957, 5, 423.
68. SOHIER R., BERNHEIM M., CHAPTAL J., JEUNE M. — Broncho-pneumopathies à virus et à rickettsies chez l'enfant. *Monographie I.N.H.*, 13, 1957.
69. SOHIER R., BENSIMON P. et LAGABRIELLE B. — Infection à adénovirus (type 7 prime) avec atteinte pulmonaire et rénale. *Bull. Soc. Méd. Paris*, 1957, 36-42.
70. STUART-HARRIS Ch. — Influenza and others virus infections of the respiratory tract. Edw. Arnold Edit., Londres, 1953.
71. THIVOLET J., FRIES D., KRATCHKO A. — La détection des facteurs antinucléaires par la technique d'immunofluorescence. Aperçu technique. Premiers résultats techniques. *Rev. Lyonn. Méd.*, 1961, 10, 1027.
72. THIVOLET J., GROSPIRON D., MURAT M. — Mise en évidence par les techniques d'immunofluorescence d'anticorps au cours de l'infection syphilitique. *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, 99, 920.
73. THIVOLET J., SOHIER R., PICARD J.-P. et BLANC G. — Application de la méthode d'immunofluorescence au diagnostic de la pneumonie due au *Mycoplasma de Eaton*. *Ann. Inst. Pasteur*, octobre 1963, 105, 749.
74. THOMAS L., MIRICK G.-S., CURNEN E.-C., ZIEGLER J1 Jr and HORSFALL F.-L. Jr. — Studies on P.A.P. II. Observations concerning the relationship of a non Hémolytic Streptococcus to the disease. *J. Clin. Inv.*, 1945, 24, 227.
75. TURNER J.-C. — Development of Cold agglutinins in atypical pneumonia. *Nature*, 1943, 151, 419.

76. VAN ROOYEN C.-E. and RHODES A.-J. — Virus diseases of Man. Thomas Nelson Co. Edit., New-York, 1948.
77. WEIR J.-M. and HORSFALL F.-L. Jr. — The recovery from patient with acute pneumonitis of a virus causing pneumonia in the mongoose. *J. Exp. Med.*, 1940, 72, 505.
-

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	21
HISTORIQUE	23
MISE EN ŒUVRE DE LA METHODE D'I.F. SUR LES COU- PES D'EMBRYONS DE POULETS	
A) Technique	33
B) Résultats de la littérature	39
APPORT PERSONNEL	
A) Technique	43
I. — Etude des réactifs entrant en jeu dans la réac- tion d'I.F. indirecte	44
II. — Description de la réaction	51
Photographies n ^{os} 1 et 2	53
B) Résultats.	
I. — Résultats obtenus avec la réaction d'I.F.	54
Tableau I	56
Tableau II	59
II. — Clinique	
1. Manifestations cliniques réalisées par la Maladie de Eaton	60
Tableau III	61
2. La Bronchopneumopathie de la Maladie de Eaton	63
3. Essai d'Epidémiologie	65
Tableau IV	67
III. — Evolution comparée des H.A.F. et des anticorps fluorescents spécifiques pour l'Agent de Eaton	68
Graphiques n ^{os} 1, 2 et 3	69
Tableau V	70-71

IV. — Problème particulier des H.A.F. au cours des infections à A.D.V.	72
Tableau VII	75

DISCUSSION

A) Technique	77
B) Résultats	81
Tableau VI	83
.....	89

CONCLUSIONS	91
-------------------	----

BIBLIOGRAPHIE	93
---------------------	----
